

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Estrategias analíticas avanzadas de obtención y análisis de
compuestos bioactivos en muestras de origen vegetal**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

María Jesús García Sarrió

DIRECTORAS

María Luz Sanz Murias
Ana Cristina Soria Monzón

Madrid

Universidad Complutense de Madrid

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Analítica



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

Tesis doctoral

Estrategias analíticas avanzadas de obtención y análisis de compuestos bioactivos en muestras de origen vegetal

María Jesús García Sarrió

Directores

María Luz Sanz Murias

Ana Cristina Soria Monzón

Instituto de Química Orgánica General
Consejo Superior de Investigaciones Científicas



Julio 2019



U N I V E R S I D A D
COMPLUTENSE
M A D R I D

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. _____,
estudiante en el Programa de Doctorado _____,
de la Facultad de _____ de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

y dirigida por: _____

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a ____ de _____ de 20__

Fdo.: _____

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.



D^a. María Luz Sanz Murias, Dra. en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Científica Titular del Instituto de Química Orgánica General del C.S.I.C.

D^a. Ana Cristina Sonia Monzón, Dra. en Ciencias Químicas, Titulada Superior de Actividades Técnicas y Profesionales en el Instituto de Química Orgánica General del C.S.I.C.

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado “**Estrategias Analíticas Avanzadas de obtención y análisis de compuestos bioactivos en muestras de origen vegetal**”, y que constituye la Memoria que presenta D^a. María Jesús García Sarrió para optar al grado de Doctor en Química Avanzada, ha sido realizado en el Departamento de Análisis Instrumental y Química Ambiental del Instituto de Química Orgánica General del C.S.I.C, bajo su dirección.

Y para que así conste, firman el presente certificado en Madrid a 6 de julio de 2019.

Fdo. D^a. María Luz Sanz Murias

Fdo. D^a. Ana Cristina Soria Monzón

A mis padres y hermano...

AGRADECIMIENTOS

Tengo que agradecer tanto a tantas personas, que resulta imposible expresarlo en unas pocas líneas.

En primer lugar quiero agradecer a Mari Luz Sanz y Ana Cristina Soria por el esfuerzo y el empeño que han puesto en que esta Tesis saliera adelante, por guiarme en este camino, por todo lo que me habéis enseñado, por vuestro apoyo y por todos los momentos que hemos compartido.

Y a mis chicos del CSIC, Andrea, Cipri, Sonia, Ana, Laura, Drash, Adal, Diego Cabo, Diego Orellana, Diana... Por tantos momentos compartidos en el laboratorio y fuera de él, por las catas, los congresos, las visitas turísticas express, y hasta las inundaciones, por los momentos de fiesta y de agobios, por vuestro apoyo, por vuestro cariño...sin todos vosotros en el camino, de verdad que nada hubiera sido igual.

A Jesús Sanz por su grandeza como persona, por lo que me ha enseñado, por hacernos partícipes siempre de su alegría y transmitirnos su juventud de espíritu, por compartir todos sus juegos, sus caches, sus cometas y por sacarme del mundo de los muggles!

A Isabel Martínez-Castro por ofrecer siempre su disponibilidad y ayuda, por compartir sus conocimientos y por ser, al igual que Jesús, un referente para todos en el laboratorio.

A Jesús Palá y Silvia Díaz por vuestra colaboración botánica y microbiológica. Por lo que me habéis enseñado, por vuestra ayuda y por lo bien que me habéis acogido cada vez que pasé por la facultad de CC Biológicas a hacer mis ensayos microbiológicos.

A Sonia Ramos por su colaboración y sus enseñanzas en toxicidad, por su amabilidad y su buena acogida. Y al grupo de Azucena González del Instituto de Ciencias Agrarias por proporcionarnos muestras vegetales, por enseñarme a testar extractos vegetales como insecticidas naturales y por la disponibilidad y amabilidad de su equipo.

A Mari Cruz Moreno Bondi por llevar a cabo la tutoría de esta Tesis Doctoral, por su rapidez en gestiones administrativas y por ofrecer siempre su ayuda y disponibilidad. A María Eugenia de León por su amabilidad, disponibilidad, eficiencia y su inconmesurable ayuda a nivel informativo y administrativo, un millón de gracias.

A los Quintanilla! Jesús, Rosa y Plácido, por vuestra colaboración y toda vuestra aportación profesional, porque vuestro humor y vuestra alegría, se contagian. Y porque es imposible cruzarse con vosotros y no sonreír.

A Juan Félix Espinosa y Alfonso Rivera, por confiar en mí desde el principio y ser los primeros en darme la oportunidad de iniciarme en el mundo de la investigación. A Juan Félix, Paloma, Luis y Aida por acogerme en ese excepcional equipo profesional y aun mejor humano. Por todo lo que aprendí de vosotros y porque la motivación que me transmitisteis ha sido un motor de valor incalculable para mis posteriores andanzas.

A mis chicos Vivotécnicos, Marta, Ana, MaríaÁngela, Herni, Rubén, María, Estefanía, David, Juanjo, Nuria, Sonia, Sofía, Ramón García, Desi, María Jesús... por vuestra acogida, por las divertidísimas y largas conversaciones llenas de contenido y las no tan largas y sin mucho sentido, por los momentos de risas desternillantes y porque sois geniales. Sois unas máquinas y eso os lo recompensará la vida...

Y por supuesto a Ramón Díaz, por enriquecerme enormemente con tus conocimientos y experiencia, por tus luchas, por el equipo que formamos, por los momentos de apoyo, por motivarme siempre y porque el trato personal fue inmejorable... y nada de esto tiene precio.

A mis amigos Diego, Gong, Alicia, Jaime, que me acompañásteis a lo largo de la carrera y espero que me acompañéis a lo largo de la vida.

A todos aquéllos con los que aprendí a bailar y os convertísteis en algo más que compañeros de baile: David, Martita, Jose, Asier, Marta, Patri, Ángeles, Victor, Ana y Mara, por los buenos momentos que me hicisteis pasar dentro y fuera de las pistas de baile.

A mis amigas de siempre, Diana, Yoli, Tamara y Rita. Porque da igual el tiempo que pase, que siempre estáis ahí.

A mi familia, en especial a mis tías, por transmitirme con su experiencia tanta sabiduría vital y fortaleza, a mi primo Jose, por estar siempre pendiente y por tus sabios consejos. A mi cuñada y a mi sobrina, que, aunque ella no se dé ni cuenta, transmite una energía y alegría explosivas.

Y por supuesto, el máximo agradecimiento es para mis padres y hermano por creer en mí, por vuestro apoyo incondicional, por enseñarme que en la vida no merece la pena preocuparse tanto, por vuestros ánimos, vuestras palabras y por transmitirme siempre alegría y positividad. Sin vosotros, no sería quien soy.

De corazón, a todos, GRACIAS.

“El secreto, querida Alicia, está en rodearte de personas que te hagan sonreír el corazón.

Es entonces y sólo entonces que estarás en el País de las Maravillas”

Lewis Carrol

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN.....	VII
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. COMPUESTOS BIOACTIVOS	3
1.2. FUENTES NATURALES DE COMPUESTOS BIOACTIVOS	4
1.2.1. Compuestos bioactivos en hojas de menta y corteza de abedul	6
1.3. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS.....	9
1.3.1. Extracción asistida por microondas (MAE)	12
1.3.2. Extracción con líquidos presurizados (PLE)	15
1.3.3. Extracción asistida por ultrasonidos (UAE)	18
1.4. ANÁLISIS DE COMPUESTOS BIOACTIVOS	22
1.4.1. Cromatografía de gases (GC).....	22
1.4.2. Cromatografía de líquidos (HPLC o LC).....	27
1.4.3. Técnicas cromatográficas multidimensionales	29
2. OBJETIVOS, METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO	33
3. DESARROLLO DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS PARA LA OBTENCIÓN DE EXTRACTOS MULTIFUNCIONALES DE CORTEZA DE ABEDUL (<i>Betula pendula</i>)	39
3.1. PREFACIO	39
3.1.1. Descripción, distribución y usos.....	39
3.1.2. Corteza de abedul: revalorización y fuente de ingredientes bioactivos.....	41
3.1.3. Extracción de compuestos bioactivos de abedul	45
3.1.4. Caracterización analítica y otros aspectos relevantes en el desarrollo de productos basados en extractos bioactivos de abedul	49
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
3.2.1. Muestras y patrones	51
3.2.2. Optimización de las condiciones de extracción por MAE	51
3.2.3. Análisis cromatográfico	53
3.2.4. Actividad inhibidora de la enzima lipasa pancreática	54
3.2.5. Contenido total de polifenoles (TPC).....	57
3.2.6. Actividad antioxidante	58
3.2.7. Evaluación de la viabilidad celular	59
3.2.8. Estabilidad durante el almacenamiento	60
3.2.9. Tratamiento con levaduras (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) de extractos MAE. 60	
3.2.10. Análisis estadístico.....	61
3.3. RESULTADOS Y DISCUSION.....	62

3.3.1.	Optimización de la extracción por MAE de compuestos bioactivos de corteza de abedul	62
3.3.2.	Caracterización y estudio de la bioactividad del extracto MAE obtenido a partir de la muestra BP1	69
3.3.2.1.	Composición en terpenoides bioactivos	69
3.3.2.2.	Actividad antilipasa.....	72
3.3.2.3.	Contenido en polifenoles totales.....	73
3.3.2.4.	Evaluación de la viabilidad celular	74
3.3.2.5.	Estabilidad durante el almacenamiento	76
3.3.3.	Aplicación del método MAE optimizado a distintas muestras de corteza de abedul.....	77
4.	DESARROLLO DE NUEVOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS A PARTIR DE HOJAS DE <i>Mentha</i> sp.	85
4.1.	PREFACIO	85
4.1.1.	Descripción, propiedades y usos de la menta.....	85
4.1.2.	Compuestos bioactivos de menta	87
4.1.3.	Extracción de compuestos bioactivos de hojas de menta.....	88
4.1.4.	Caracterización analítica de compuestos bioactivos de menta.....	90
4.2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	92
4.2.1.	Muestras de menta	92
4.2.2.	Patrones.....	93
4.2.3.	Procedimientos de extracción.....	93
4.2.3.1.	Selección del disolvente	93
4.2.3.2.	Obtención de extractos multifuncionales etanólicos	94
4.2.3.2.1.	Selección de la técnica de extracción	94
➤	Extracción sólido-líquido (SLE).....	94
➤	Extracción asistida por ultrasonidos (UAE)	94
➤	Extracción asistida por microondas (MAE)	94
4.2.3.2.2.	Optimización de condiciones de extracción por MAE para la obtención de extractos multifuncionales etanólicos.....	95
4.2.3.3.	Obtención de extractos multifuncionales acuosos	96
➤	Extracción asistida por ultrasonidos (UAE)	96
➤	Extracción asistida por microondas (MAE)	97
➤	Extracción con líquidos presurizados (PLE)	97
4.2.3.3.2.	Optimización de las condiciones de extracción por MAE para la obtención de extractos multifuncionales acuosos.....	98
4.2.3.3.3.	Optimización de las condiciones de extracción por PLE	99
4.2.4.	Análisis Instrumental.....	100

4.2.4.1.	Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas	100
4.2.4.2.	Cromatografía de Líquidos-Espectrometría de Masas	101
4.2.5.	Enriquecimiento en terpenoides bioactivos de los extractos MAE	103
4.2.5.1.	Tratamiento con Carbón Activo (AC)	103
4.2.5.2.	Extracción en fase sólida (SPE)	103
4.2.6.	Contenido total de polifenoles (TPC)	103
4.2.7.	Actividad antioxidante	104
4.2.7.1.	Ensayo con el radical libre estable DPPH·	104
4.2.7.2.	Ensayo con ABTS ⁺	105
4.2.8.	Evaluación de la actividad antimicrobiana	106
4.2.9.	Análisis estadístico	107
4.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	108
4.3.1.	Selección del disolvente	108
4.3.2.	Obtención de extractos etanólicos multifuncionales a partir de hojas de menta	110
4.3.2.1.	Selección de la técnica óptima para la extracción de terpenoides bioactivos de menta	110
4.3.2.2.	Selección de condiciones óptimas para la obtención de extractos etanólicos multifuncionales por MAE	117
4.3.2.3.	Evaluación de diferentes procesos de enriquecimiento en terpenoides de los extractos obtenidos por MAE	124
4.3.2.4.	Aplicación del método MAE optimizado a muestras de <i>M. rotundifolia</i> de distintos años de recogida	125
4.3.3.	Obtención de extractos acuosos multifuncionales a partir de hojas de menta	129
4.3.3.1.	Selección de la técnica óptima	129
4.3.3.2.	Optimización de la extracción asistida por microondas para la obtención de extractos acuosos multifuncionales	130
4.3.3.3.	Optimización de la extracción con líquidos presurizados para la obtención de extractos acuosos multifuncionales	135
4.3.3.4.	Comparación de las técnicas MAE y PLE para la obtención de extractos acuosos multifuncionales	142
4.3.3.5.	Aplicación del método MAE optimizado a distintas especies de menta	143
4.3.3.5.1.	Análisis cualitativo de compuestos fenólicos	143
4.3.3.5.2.	Análisis cuantitativo de compuestos fenólicos	156
4.3.3.5.3.	TPC y actividad antioxidante	164
	CONCLUSIONES	171
	ANEXOS	202

TERMINOLOGÍA

TERMINOLOGÍA

En este apartado se detallan las abreviaturas y acrónimos utilizados en esta Memoria, así como sus correspondientes significados. Se han mantenido en su versión original aquellos términos o acrónimos cuya traducción al castellano no está suficientemente implantada y cuyo empleo podría dar lugar a confusión.

^{13}C -NMR	Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C
^1H -NMR	Resonancia Magnética Nuclear de protón
Abs	Absorbancia
AC	Carbón activo
APCI	Ionización química a presión atmosférica
ASE	Extracción acelerada con disolventes
BSTFA	bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida
CI	Ionización química
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazilo
DTD	Desorción térmica directa
ESI	Ionización por electrospray
FID	Detector de ionización de llama
FRAP	Potencial antioxidante reductor del hierro
GAE	Equivalentes de ácido gálico
GC	Cromatografía de gases
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
GC×GC	Cromatografía de gases bidimensional completa
GRAS	Disolvente generalmente reconocido como seguro
HILIC	Cromatografía de interacción hidrofílica
HMDS	Hexametildisilazano
HPLC (o LC)	Cromatografía de líquidos de alta eficacia
HPLC-DAD	Cromatografía de líquidos acoplada a un detector de diodo array
HPLC-MS	Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas
HPLC-Q ToF MS	Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas con analizador híbrido cuadrupolo tiempo de vuelo

IC ₅₀	Concentración de reactivo que inhibe el 50% target
IT	Trampa iónica
<i>I'</i>	Índice de retención lineal
LC×LC	Cromatografía de líquidos bidimensional completa
LLE	Extracción líquido-líquido
LMWC	Carbohidratos de bajo peso molecular
MAE	Extracción asistida por microondas
MS ²	Espectrometría de masas en tándem
MW	Microondas
MLR	Regresión lineal múltiple
ORAC	Capacidad captadora de radicales oxígeno
PLE	Extracción con líquidos presurizados
PSE	Extracción con disolventes presurizados
QMS	Analizador cuadrupolar de espectrometría de masas
RPLC	Cromatografía líquida de fase inversa
SHWE	Extracción con agua subcrítica o sobrecalentada
SDE	Microextracción-destilación simultánea
SIM	Registro selectivo de iones
SLE	Extracción sólido-líquido
SPE	Extracción en fase sólida
SPME	Microextracción en fase sólida
TE	Equivalentes de Trólox
TMCS	Trimetilclorosilano
TMSI	Trimetilsililimidazol
TMSO	Trimetilsilil oximas
TPC	Contenido en polifenoles totales
<i>t_R</i>	Tiempo de retención
UAE	Extracción asistida por ultrasonidos
US	Ultrasonidos

RESUMEN/SUMMARY

RESUMEN

La necesidad por parte de la industria alimentaria de dar respuesta a los nuevos hábitos alimenticios, así como la mayor concienciación actual sobre la relación entre alimentación y salud, han despertado el interés por el desarrollo de nuevos alimentos con propiedades beneficiosas para la salud (alimentos funcionales). Los efectos beneficiosos descritos para estos alimentos diversos y dependen de las propiedades (antioxidantes, antiobesidad, etc.) de los compuestos bioactivos que contienen. Si además los ingredientes empleados poseen compuestos que ejercen un efecto combinado de protección frente a varias enfermedades (ingredientes multifuncionales), el interés es todavía mayor. Por otra parte, la creciente demanda por parte del consumidor de nuevos productos con un potencial efecto beneficioso sobre la salud como los complementos alimenticios, de biocidas de origen natural de aplicación como conservantes alimentarios, etc, ha favorecido también la búsqueda de fuentes alternativas para la obtención de extractos multifuncionales. En este sentido, y dentro de un contexto de economía circular, la obtención de dichos extractos a partir de residuos es una interesante opción a considerar.

En esta Memoria se exponen los resultados más relevantes del trabajo titulado “Estrategias analíticas avanzadas de obtención y análisis de compuestos bioactivos en muestras de origen vegetal”. El objetivo principal de este trabajo ha sido el desarrollo de nuevas metodologías, basadas en técnicas avanzadas como la extracción asistida por microondas (MAE) o por ultrasonidos (UAE) y la extracción con líquidos presurizados (PLE), para la obtención de extractos multifuncionales, así como la caracterización de estos extractos mediante cromatografía de gases y de líquidos acopladas a espectrometría de masas (GC-MS y LC-MS), y la evaluación de sus propiedades bioactivas, estabilidad y seguridad. De acuerdo a las dos matrices vegetales estudiadas, los resultados correspondientes a la obtención y caracterización de extractos multifuncionales de corteza de abedul (*Betula* sp.) se incluyen en la Sección 3, mientras que los correspondientes a hojas de *Mentha* sp. se muestran en la Sección 4.

Para la obtención de extractos multifuncionales de abedul se ha optimizado, mediante un diseño experimental, un método MAE a partir de corteza de *B. pendula*, evaluándose por primera vez la influencia de temperatura y tiempo de extracción, número de ciclos, etc. sobre la extracción de compuestos bioactivos, así como sobre su actividad

antilipasa y antioxidante. La evaluación de la estabilidad y la viabilidad celular de los extractos obtenidos en condiciones óptimas (50 °C, 13 minutos, 0,5 g de muestra seca, 10 mL de metanol, 1 ciclo) puso de manifiesto su potencial como ingredientes multifuncionales estables y seguros. El análisis multicomponente por GC-MS de los extractos de distintas especies de abedul, previa derivatización, permitió determinar un total de 22 compuestos, entre ellos terpenoides con estructura tipo lupano, compuestos fenólicos, etc. Además, el análisis cuantitativo evidenció la gran variabilidad en su concentración en función de la especie considerada. Estos estudios ponen de manifiesto la utilidad de la MAE como metodología rápida y eficaz para la obtención de extractos multifuncionales de corteza de abedul, contribuyendo así a la revalorización de este residuo de la industria maderera como una nueva fuente de ingredientes bioactivos de aplicación en distintos campos (alimentos funcionales, nutraceúticos, cosmética, etc.)

Respecto a la obtención de extractos de hojas de *Mentha* sp., género cuyas múltiples bioactividades podrían explotarse en una gran variedad de nuevas aplicaciones (e.g. conservantes alimentarios), en primer lugar, se evaluó el efecto del disolvente extractante. El agua y etanol se seleccionaron por su eficacia, asequibilidad, por ser disolventes de grado alimentario y cuya producción es respetuosa con el medio ambiente. En el caso de los extractos etanólicos, la MAE resultó ser la técnica más ventajosa en cuanto a rendimiento y reproducibilidad, en comparación con la extracción sólido-líquido y la UAE, para la extracción de terpenoides bioactivos. La optimización mediante un diseño de experimentos de las condiciones MAE (100 °C, 24 min, 1,5 g de muestra seca, 10 mL etanol, 1 ciclo), permitió obtener extractos ricos en terpenoides bioactivos, con alto contenido en polifenoles totales y con actividad antioxidante a partir de hojas de *M. rotundifolia*. Los extractos sometidos a un tratamiento posterior con carbón activo presentaron un mayor enriquecimiento en terpenoides bioactivos, mejorando su aplicabilidad como conservante alimentario. Sin embargo, la actividad antioxidante de estos extractos fue menor, por lo que este tratamiento se descartó para aplicaciones orientadas a la obtención de ingredientes alimentarios con ambas bioactividades. El análisis por GC-MS de la composición de extractos MAE etanólicos permitió determinar un total de 46 compuestos, principalmente terpenoides (monoterpenos, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos, etc.). Otros compuestos detectados, como los isómeros del neofitadieno, se han descrito por primera vez en estos extractos.

Asimismo, se ha llevado a cabo una comparación entre MAE, PLE y UAE para la obtención de extractos acuosos multifuncionales (con actividad antioxidante y actividad antimicrobiana) a partir de hojas de *M. rotundifolia*. La optimización de las correspondientes condiciones experimentales mostró que, tanto PLE como MAE, resultaron adecuadas para este fin, seleccionándose MAE para su aplicación a distintas especies de menta, por presentar ventajas en cuanto al rendimiento de extracción de compuestos fenólicos totales y al volumen de disolvente empleado. Los análisis de estos extractos por LC-MS empleando un analizador híbrido de cuadrupolo tiempo de vuelo (QToF MS) y un cuadrupolo sencillo (Q MS) permitieron la caracterización de 43 compuestos fenólicos y la cuantificación de los mayoritarios, respectivamente. Los estudios de bioactividad demostraron que todos los extractos MAE poseían actividad antioxidante, presentando la mayoría de ellos actividad moderada frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* y siendo ésta diferente en función de la especie considerada. El extracto de *M. cervina* fue el único que resultó activo frente a *C. albicans*. Es de destacar que ésta es la primera vez que se lleva a cabo una caracterización exhaustiva sobre la composición y actividad de extractos de *Mentha* sp. obtenidos por MAE.

Los resultados de carácter multidisciplinar sobre la obtención y caracterización de extractos vegetales multifuncionales descritos en esta Tesis, suponen una contribución destacable al desarrollo de nuevos ingredientes alimentarios, conservantes naturales, etc. de aplicación en diversos campos dentro de un marco de producción sostenible, tema éste de gran repercusión científica, económica y social.

SUMMARY

The need of the food industry to give answer to the new feeding habits of the society, as well as the current awareness for food and health relationship, have attracted interest in the development of new foods with beneficial properties for health (functional foods). The wide number of beneficial effects (antioxidant, antimicrobial, etc.) associated with these foods depends on the composition in bioactive compounds. Moreover, if these functional foods contain ingredients that exert a combined effect on protection against various diseases (multifunctional ingredients), the interest is even higher. On the other hand, the increasing demand by the consumer of new products such as food supplements, biocides of natural origin for their application as food preservatives, etc, has stimulated the search for alternative sources to obtain multifunctional extracts. In this sense, and within a circular economy context, extracts obtained from industrial byproducts is an option worthy of being evaluated.

In this PhD dissertation, the most relevant results of the work entitled “Advanced analytical strategies for extraction and analysis of bioactive compounds from plant samples” are presented. The main objective of this work was the development of new methodologies by microwave assisted extraction (MAE), ultrasound assisted extraction (UAE) or pressurized liquid extraction (PLE) for obtaining multifunctional extracts and for their characterization by gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS and LC-MS). Moreover, the evaluation of bioactive properties, stability and safety of these extracts has also been considered in the present study. According to the plant matrices considered, the results corresponding to multifunctional extracts of birch (*Betula* sp.) bark are included in Section 3, while those from leaves of *Mentha* sp. are shown in Section 4.

To obtain multifunctional extracts from *B. pendula* bark, a MAE method was optimized by an experimental design. The influence of temperature and extraction time, number of cycles, etc., was evaluated for the first time on the extraction of bioactive compounds, as well as on their antilipase and antioxidant activities. The study of the thermal stability and cell viability of the extracts obtained under optimal conditions (50 °C, 13 minutes, 0.5 g dry sample, 10 mL methanol, 1 cycle) highlighted their potential as stable and safe multifunctional ingredients. The multicomponent analysis by GC-MS of the extracts of different birch species, previously derivatized, allowed to determine a total of 22 compounds, including terpenoids with lupane structure, phenolic compounds, etc.

In addition, their quantitative analysis showed the wide variability for their concentration depending on the species considered. These studies highlight the utility of the MAE methodology developed as a fast and efficient strategy for obtaining multifunctional extracts of birch bark. Furthermore, these results can also be considered as a valuable contribution to revalorize this residue from the wood industry as a new source of bioactive ingredients of application in different fields (functional foods, nutraceuticals, cosmetics, etc.).

Mentha sp. is a genus with multiple bioactivities that are yet to be fully exploited in a number of different applications (e.g. food preservatives). To that aim, the optimization of improved processes for extraction of mint bioactives is a requirement. In Section 4, the effect of the extractant solvent was first evaluated. Taking into account the extraction efficacy, affordability, green character and potential for food industry applications, both water and ethanol were selected. In the case of the ethanolic extracts, MAE was the most advantageous technique for the extraction of bioactive terpenoids in terms of performance and reproducibility, as compared to solid-liquid extraction (SLE) and UAE. The optimization, using an experimental design, of the MAE conditions (100 °C, 24 min, 1.5 g of dry sample, 10 mL ethanol, 1 cycle), provided extracts rich in bioactive terpenoids, with a high content of total polyphenols and with antioxidant activity from leaves of *M. rotundifolia*. The subsequent treatment of these extracts with activated carbon gave rise to a higher enrichment in bioactive terpenoids and therefore, to their improved applicability as a food preservative. However, the antioxidant activity of these extracts was lower, so this treatment was discarded for applications in which multifunctional ingredients are addressed. A total of 46 compounds, mainly monoterpenes, oxygenated monoterpenes, sesquiterpenes, etc., were determined by GC-MS in ethanol MAE extracts; other compounds such as different neophytadiene isomers, were also detected for the first time in these extracts.

Likewise, a comparison between MAE, PLE and UAE to obtain multifunctional (with antioxidant activity and antimicrobial activity) aqueous extracts from leaves of *M. rotundifolia* was carried out. The optimization of the experimental conditions showed that, both PLE and MAE, were suitable for this purpose. Due to its advantages in terms of extraction yield of total phenolic compounds and the lower volume of extractant solvent, MAE was selected for its further application to different mint species. The

analysis of these extracts by LC-MS using a quadrupole time of flight (QToF) and a single quadrupole (Q) as MS analyzers, allowed the characterization of 43 phenolic compounds and the quantitation of the most abundant phenolics, respectively. Regarding the bioactivity studies, all MAE extracts showed noticeable antioxidant activity. In addition, most of them also presented moderate activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*; this activity was dependent on the species considered. The *M. cervina* extract was the only one active against *C. albicans*. It is noteworthy that this is the first time that an exhaustive characterization of the composition and bioactivity of *Mentha* sp. MAE extracts has been carried out.

The results of this multidisciplinary study on the obtainment and characterization of multifunctional plant extracts represent a remarkable contribution to the development, within a bioeconomy context, of new food ingredients, natural preservatives, etc. of application in different fields. This topic is of great scientific, economic and social relevance.

INTRODUCCIÓN

...Contra cada padecimiento crece una planta (Paracelso S. XVI)

1. INTRODUCCIÓN

1.1. COMPUESTOS BIOACTIVOS

En la actualidad, la sociedad está cada vez más concienciada del efecto que tiene la alimentación sobre la salud humana. Es sabido que muchos alimentos tradicionales, como legumbres, verduras, frutas, pescado, etc. contienen componentes que pueden resultar beneficiosos para la salud. Sin embargo, la necesidad de dar respuesta a nuevos hábitos alimenticios y la concienciación por un buen estado de salud, ha despertado el interés por el desarrollo de nuevos alimentos preparados a partir de los tradicionales, pero que incorporen compuestos beneficiosos para la salud del consumidor. Son los denominados **alimentos funcionales**, que pueden ser alimentos que contienen uno o varios componentes bioactivos o se le han quitado o modificado otros componentes, mediante distintos procesos tecnológicos o biológicos (FUFOSE, 1999). Estos alimentos no sólo permiten cubrir las necesidades nutricionales básicas del hombre, sino que contienen ingredientes que desempeñan una actividad específica en las funciones fisiológicas del organismo humano, aportando efectos beneficiosos adicionales para la salud, mejorando el bienestar físico y reduciendo el riesgo de aparición de algunas enfermedades (Ferreira-Montero y Luengo-Fernández, 2007).

Los efectos beneficiosos descritos para los alimentos funcionales son muy diversos y dependen de las propiedades (antioxidantes, antimicrobianas, etc.) del compuesto bioactivo concreto. En general, se ha observado que muchos compuestos ejercen efectos beneficiosos sobre el retardo del envejecimiento, protección cardiovascular, control de la obesidad, protección contra el cáncer, etc. El interés por estos alimentos es aún mayor si los ingredientes empleados ejercen un efecto combinado sobre la protección contra varias de estas enfermedades. A dichos ingredientes se les denomina **multifuncionales**.

Es importante señalar que, además de las propiedades bioactivas que aportan estos compuestos, pueden también conferir color, aroma y sabor a los alimentos, lo que debe considerarse específicamente para cada producto, ya que pueden contribuir a su aceptación o rechazo por parte del consumidor.

Por otra parte, los compuestos bioactivos no sólo son de especial relevancia para la industria alimentaria en su aplicación como ingredientes funcionales, sino que también

pueden ser de interés como **conservantes alimentarios** (Silva-Weiss y col., 2013), entre otros usos. Además, muchos de estos compuestos bioactivos son también la base de diversos **nutraceúticos** (complementos alimenticios), así como de una gran variedad de productos farmacéuticos y cosméticos (cremas fotoprotectoras, anti-envejecimiento, etc.), productos todos ellos muy demandados en la actualidad (Gil-Chávez y col., 2013; Chien-Hsing y col., 2017).

La gran diversidad de aplicaciones previamente comentadas ha hecho que la obtención de nuevos compuestos bioactivos a partir de fuentes naturales haya despertado en los últimos años un gran interés, tanto desde el punto de vista científico, como del de su posible explotación industrial en distintos campos (Cárdenas-Baquero y col., 2015). En este sentido, resulta determinante el avance en la búsqueda de **nuevas fuentes** ricas en compuestos bioactivos, el **desarrollo de métodos de extracción** de dichos compuestos que, además de eficaces, sean respetuosos con el medio ambiente, y la puesta a punto y validación de **métodos analíticos** que permitan la caracterización estructural de sus componentes, con el fin de poder establecer relaciones estructura-actividad biológica.

1.2. FUENTES NATURALES DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

La obtención de compuestos bioactivos a partir de fuentes naturales es una alternativa interesante frente a su obtención mediante síntesis química, al ser percibidos por el consumidor como productos más saludables.

En los alimentos de origen animal se pueden encontrar diversos compuestos bioactivos, tales como ácidos grasos poliinsaturados en pescados, péptidos en lácteos, luteína en huevo, etc. Sin embargo, son los vegetales las fuentes naturales más ricas en compuestos bioactivos de distinta naturaleza, entre otros, terpenoides, polifenoles, inositoles, iminoazúcares, etc. Estos componentes, también denominados **fitoquímicos**, poseen funciones específicas en el crecimiento y supervivencia de las plantas y su consumo proporciona al ser humano distintos beneficios sobre la salud. Son, por ello, las plantas, las fuentes naturales más empleadas para la obtención de extractos ricos en compuestos con distinta bioactividad (Sasidharan y col., 2011). Entre ellas, las **plantas aromáticas** de la familia Lamiaceae, que incluye géneros como el romero (*Rosmarinus* sp.), la menta (*Mentha* sp.), el tomillo (*Thymus* sp.), la salvia (*Salvia* sp.), etc., son algunos de los que han despertado mayor interés, dada la diversidad de productos (infusiones,

aceites esenciales, extractos, etc.) de ellas derivados y para los que se han descritos distintos efectos beneficiosos sobre la salud (Proestos y col., 2005; Pereira y Cardoso, 2013; Vicente y col., 2013; Rodríguez-Solana y col., 2014).

Alternativamente, y dentro de un contexto de economía circular en el que se optimice el aprovechamiento de los recursos naturales, se está prestando también gran atención al aprovechamiento de los residuos generados en la actividad industrial de distintos sectores. La industria agroalimentaria genera una enorme cantidad de **residuos y subproductos** (hojas, pieles, cáscaras de frutos, etc.) que se aprovechan sólo en una pequeña parte, siendo el resto incinerados o enviados a vertederos con el consiguiente impacto negativo para el medioambiente y la pérdida de recursos económicos derivados de su aprovechamiento. La reutilización de estos residuos tiene un enorme potencial para la obtención de compuestos beneficiosos para la salud que pueden incorporarse como ingredientes en la elaboración de alimentos funcionales, nutraceuticos o cosméticos. Así, se han obtenido pectinas de la cáscara de la vaina del cacao (Muñoz-Almagro y col., 2019), compuestos fenólicos de subproductos de la aceituna (Fernández-Bolaños y col., 2006), taninos de cáscaras de castaña (Aires y col., 2016), etc. Menos estudiados hasta el momento son los residuos derivados de la **industria maderera**, generados también en un importante volumen, como el follaje de los árboles empleado para la obtención de aceites esenciales (Díaz, 1998) o la corteza de diversos árboles que da lugar a extractos ricos en distintos terpenoides bioactivos (Diouf y col., 2009; St-Pierre y col., 2013).

Pero la reutilización de residuos para incrementar la sostenibilidad de los procesos no tendría sentido si no se lleva a cabo mediante tecnologías que respeten los principios de la química verde y sean económicamente rentables. De ahí la relevancia, como se ha comentado previamente, de la **optimización y evaluación de nuevas tecnologías** que proporcionen ventajas con respecto a los métodos convencionales para la obtención de **extractos con propiedades bioactivas**.

1.2.1. Compuestos bioactivos en hojas de menta y corteza de abedul

De entre los fitoquímicos descritos en fuentes vegetales, en esta Memoria nos centraremos en los terpenoides y polifenoles, por ser los compuestos principales de las muestras en estudio en esta Tesis (hojas de menta y corteza de abedul).

Los **polifenoles** constituyen uno de los grupos de metabolitos secundarios más numerosos en las plantas, siendo esenciales para su fisiología, ya que contribuyen a su morfología, crecimiento y reproducción. Además, están involucrados en los mecanismos de defensa de las plantas frente a agentes externos como la radiación ultravioleta, el estrés hídrico, o la agresión de patógenos y predadores (Bravo, 1998). A lo largo de la historia se les ha atribuido también efectos beneficiosos frente al desarrollo de diversas enfermedades asociadas al estrés oxidativo (cáncer, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas) (Scalbert y col., 2005), además de otras muchas actividades biológicas (anti-inflamatoria, anti-viral, anti-bacteriana, anti-trombogénica, etc.) (Sampaio-Cutrim y Sloboda-Cortez, 2018).

Los polifenoles pueden clasificarse en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos. Así, los principales grupos de polifenoles son: flavonoides, ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos, estilbenos y lignanos. A su vez cada uno de estos grupos, incluye distintas subclases (e.g. flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianidinas y flavanoles son incluidos en la categoría de flavonoides). La **Figura 1.1** muestra las estructuras químicas de compuestos representativos de algunos de los principales grupos de polifenoles descritos en menta.

-Introducción-

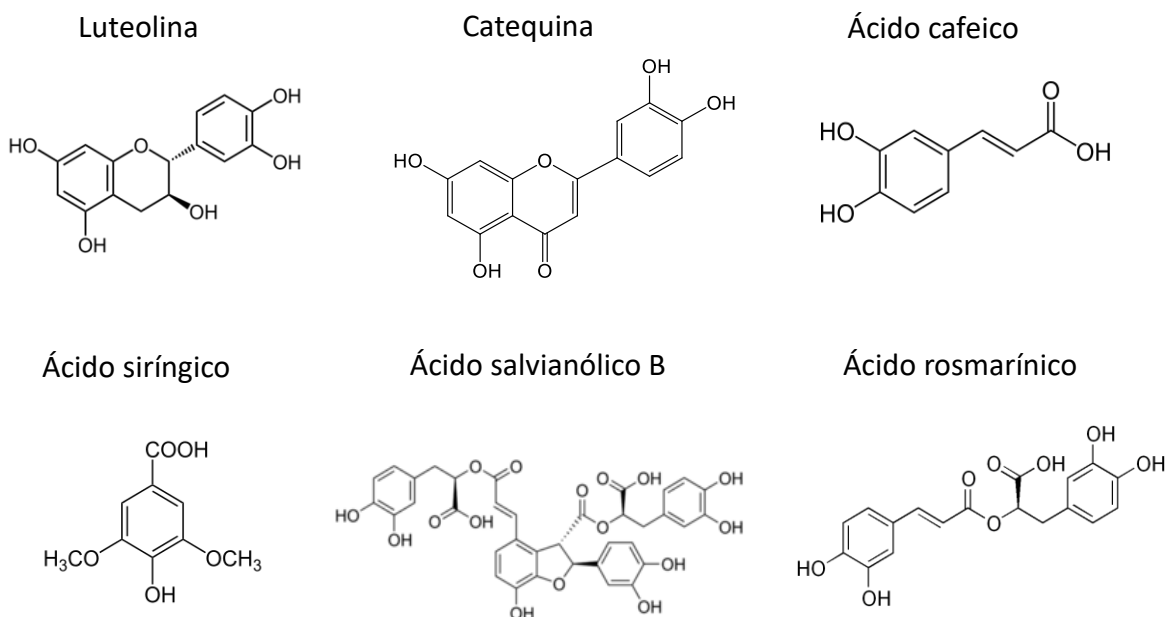


Figura 1.1. Polifenoles (ejemplos de flavona, flavanol y ácidos fenólicos) descritos en hojas de menta (Pereira y Cardoso, 2013; Taamalli y col., 2015; Patonay y col., 2017).

Por su parte, los **terpenoides** constituyen un grupo de más de treinta mil metabolitos secundarios derivados del isopreno que desempeñan distintas funciones (e.g. defensa de las plantas frente a infecciones víricas, bacterianas o parásitas) y pueden encontrarse en hongos, algas, plantas e incluso en algunos animales como insectos y organismos marinos. En función del número de unidades de isopreno se clasifican en hemiterpenos (una unidad de isopreno, C5), monoterpenos (2 unidades, C10), sesquiterpenos (3 unidades, C15), diterpenos (4 unidades, C20), triterpenos (6 unidades, C30), etc. Se les han atribuido diversas bioactividades, siendo algunas de las más destacadas antibacteriana, antifúngica, antioxidante, anti-inflamatoria, antitumoral, anti-sida, hepatoprotectora, etc. (Ruiz del Castillo y col., 2004; Saeed y Tariq, 2005; Yoon y col., 2010). A modo de ejemplo, las **Figuras 1.2 y 1.3** muestran, respectivamente, algunos de los terpenoides más característicos descritos en hojas de menta y corteza de abedul.

-Introducción-

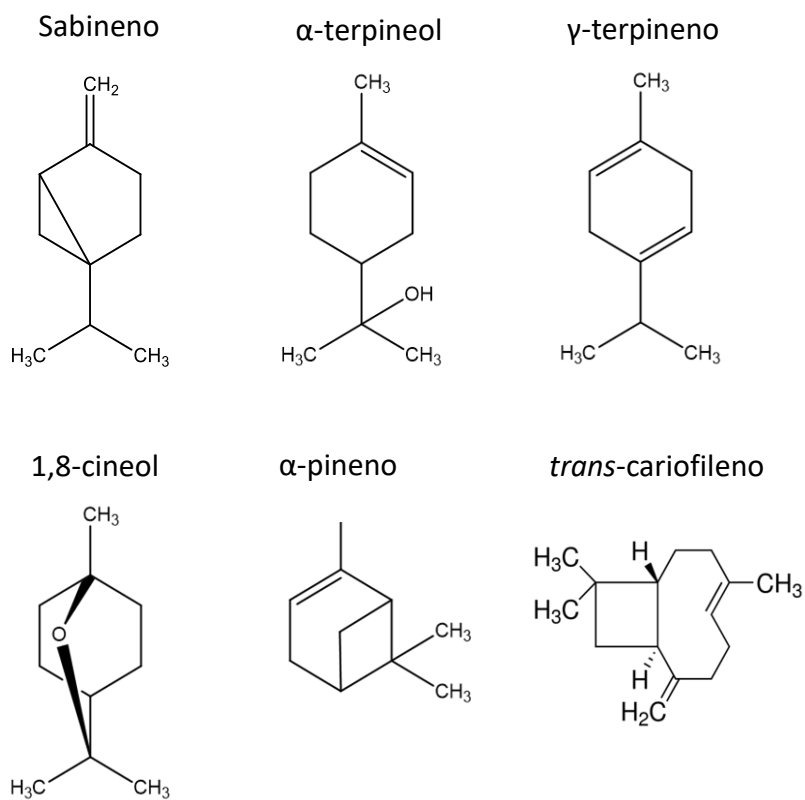


Figura 1.2. Terpenoides descritos en hojas de menta (Saeed y Tariq, 2005; Ruiz del Castillo y col., 2004)

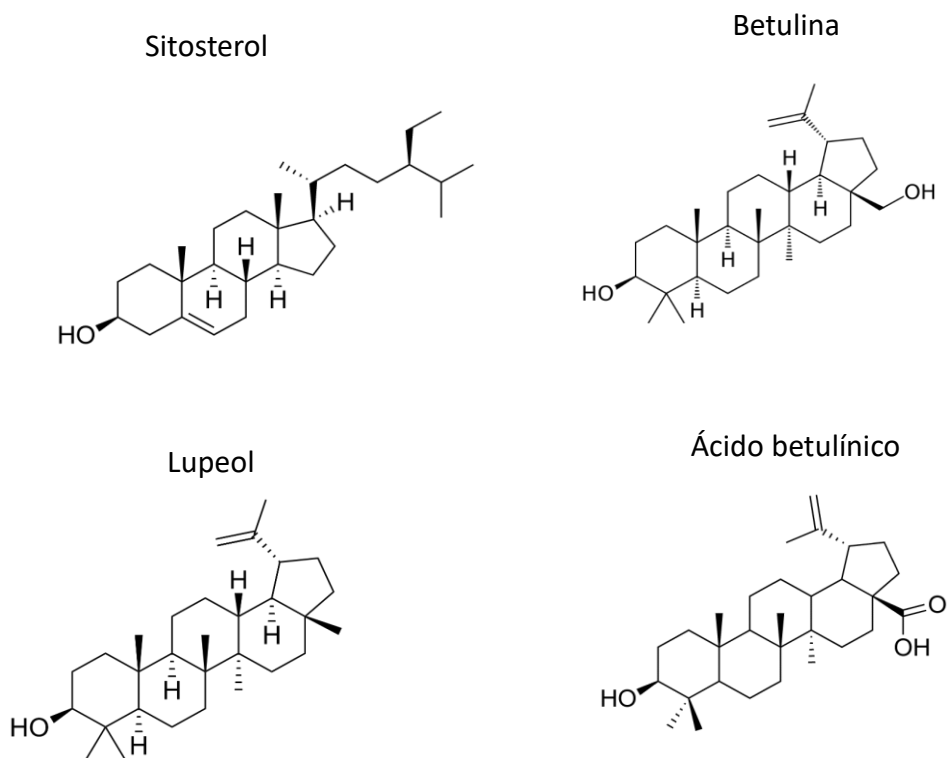


Figura 1.3. Terpenoides descritos en corteza de abedul (Abyshev y col., 2007; Jäger y col., 2008; Jäger y col., 2009; Koptelova 2014).

1.3. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

El objetivo principal de la extracción de compuestos bioactivos a partir de muestras o residuos vegetales es aunar, si es posible, la máxima recuperación de compuestos bioactivos (altos rendimientos de extracción) a partir del material vegetal de partida, con la mayor selectividad de la extracción en cuanto al/los compuesto/s bioactivos de interés.

La extracción es un proceso químico que utiliza disolventes en un amplio rango de polaridades y cuyo fundamento puede ser muy variado en función de la técnica elegida (Ferreira y col., 2013a). El tipo de compuestos extraídos y la bioactividad de los extractos obtenidos están, por tanto, estrechamente relacionados con la técnica de extracción empleada (Castro-López y col., 2017).

De entre las técnicas clásicas de extracción, la **destilación** es la técnica más usada para la obtención de la fracción volátil de productos naturales, siendo comúnmente empleada para obtener aceites esenciales a partir de diversas especies de plantas aromáticas (Gulluce y col., 2007; Tschiggerl y Bucar, 2010; Riahi y col., 2013). Existen distintas modalidades (hidrodestilación, destilación en corriente de vapor, etc.), todas ellas basadas en el calentamiento de la muestra, bien en un medio acuoso (hidrodestilación) o por contacto con vapor de agua (destilación en corriente de vapor), hasta que sus componentes más volátiles pasan a fase vapor, para ser posteriormente recuperados por un proceso de enfriamiento. De entre estas modalidades, la hidrodestilación es la más comúnmente empleada a escala industrial, y la destilación en corriente de vapor la que da lugar a una menor degradación de compuestos lábiles. Además de estas modalidades, en los últimos años se han desarrollado también metodologías basadas en esta técnica en las que se utiliza una fuente adicional de energía (US, MW) o la combinación de varias para mejorar el rendimiento y reducir el tiempo de extracción, incluso se han desarrollado técnicas como la extracción por microondas sin disolvente (SFME), que utiliza el agua de la propia muestra para la obtención de aceites esenciales con propiedades bioactivas (Wang y Weller, 2006; Mahboubi y Haghi, 2008).

Por otra parte, cuando el objetivo es la obtención a partir de muestras vegetales de extractos ricos en compuestos bioactivos de media y baja volatilidad, la **extracción sólido-líquido (SLE)** es una de las técnicas más utilizadas, dada su facilidad de operación. En SLE, la muestra junto con el disolvente extractante se someten a agitación

-Introducción-

durante un periodo de tiempo previamente establecido, con el fin de que el disolvente penetre en la matriz, dando lugar así a la difusión del analito hacia la superficie externa de la matriz y su transferencia por solubilización en el disolvente que la rodea. Una vez concluido el proceso de SLE, se procede a la separación del residuo de la fase líquida mediante filtración, decantación o centrifugación (Berk, 2013).

El rendimiento del proceso de extracción depende del tamaño de partícula de la muestra, del disolvente utilizado, de la relación entre la cantidad de muestra y el volumen de disolvente, del tiempo y de la temperatura a la que se lleve a cabo la extracción, y de la existencia o no de agitación, siendo necesaria la optimización de todos estos parámetros para el desarrollo del método.

- El **tamaño de partícula** de la muestra debe ser lo más pequeño posible para aumentar así la relación entre el volumen de disolvente que solvata a la partícula y la superficie de ésta, lo que favorecerá la extracción. Es por ello que, por lo general, cuando se trabaja con matrices vegetales, en primer lugar, se seca la muestra para a continuación triturarla y tamizarla, asegurando de este modo un tamaño de partícula pequeño y homogéneo.
- El **disolvente** seleccionado resulta un factor clave en la extracción, puesto que los analitos serán extraídos en mayor o menor medida en función de su afinidad por el mismo, principalmente en cuanto a polaridad se refiere. Una vez seleccionado el disolvente, es necesario optimizar también la relación entre la cantidad de muestra y el volumen de disolvente, ya que ésta condiciona también la extracción. Cobra especial relevancia para el uso de los extractos obtenidos en los campos de la industria alimentaria, farmacéutica o cosmética, la posibilidad de utilizar disolventes seguros, también denominados GRAS (Generally Recognized As Safe), entre los cuales se encuentran el etanol y el agua.
- La **temperatura** es otro de los factores determinantes, ya que facilita la difusión y la solubilización de los analitos, además de reducir la viscosidad del disolvente extractante, lo que contribuye también a aumentar el rendimiento en la extracción de compuestos térmicamente estables.
- La **agitación** mejora la velocidad de transferencia de masa desde la superficie de la partícula hacia el disolvente, favoreciendo por tanto la velocidad y el rendimiento de la extracción.

-Introducción-

La SLE es una técnica de extracción sencilla y de fácil implementación, sin embargo, presenta diversas limitaciones como largos tiempos de extracción, elevados volúmenes de disolvente, bajas recuperaciones para determinados compuestos, etc. Por ello, se han desarrollado también diversas técnicas de extracción, cuyo fundamento se basa en la combinación de varias de las técnicas previamente comentadas.

Un ejemplo de ello es la **microextracción-destilación simultánea (SDE)**, una técnica de fundamento mixto, que consiste en la combinación de una destilación en corriente de vapor y una extracción con disolventes. La SDE resulta particularmente adecuada para el aislamiento de compuestos de volatilidad media o baja, para los que se obtienen recuperaciones elevadas en un tiempo de extracción relativamente breve (aproximadamente 1 h), incluso a partir de pequeñas cantidades de muestra. Si bien esta técnica presenta como ventajas el concentrar los volátiles extraídos en un pequeño volumen de disolvente y el obtener extractos libres de compuestos no volátiles, las pérdidas por evaporación en la etapa de concentración del extracto y la solubilización en la fase acuosa de los compuestos de mayor polaridad o las posibles degradaciones asociadas al calentamiento de la muestra en un medio acuoso, constituyen sus principales inconvenientes (Castro-Vázquez y col., 2003; Lin y col, 2013).

Otra técnica de fundamento mixto, principalmente empleada para la extracción de compuestos de naturaleza lipídica, es la extracción con **Soxhlet** (Garavand y col., 2019; Gu y col., 2019). En este caso, la extracción se produce mediante sucesivos ciclos de evaporación y condensación de disolvente orgánico que, al caer sobre la muestra situada en un cartucho, permiten la extracción y el enriquecimiento del disolvente en los compuestos bioactivos de interés. Es una técnica sencilla, eficaz y con posibilidad de automatización, sin embargo, el tiempo de operación y de residencia del disolvente en el lecho de la muestra es extremadamente largo, lo que puede afectar a la bioactividad del extracto.

Si bien las técnicas clásicas previamente comentadas se han utilizado y se utilizan dada su popularidad y sencillez de manejo, para determinadas aplicaciones relacionadas con la obtención de extractos vegetales ricos en compuestos bioactivos, presentan como limitación común el resultar metodologías largas y tediosas y que conllevan un gran consumo de disolventes. Por ello, y con el fin de servir de base para el desarrollo de nuevas metodologías más rápidas y eficaces, con mayor automatización y respetuosas

con el medio ambiente, y de menor coste que las convencionales (Rodríguez-Sánchez y col., 2013; Azmir y col., 2013), en la última década han surgido las denominadas técnicas avanzadas de extracción que incluyen, entre otras, la extracción asistida por microondas (**MAE**), la extracción con líquidos presurizados (**PLE**), o la extracción asistida por ultrasonidos (**UAE**).

1.3.1. Extracción asistida por microondas (MAE)

Las microondas son radiaciones electromagnéticas no ionizantes, es decir, que carecen de la energía suficiente para producir ionización. Esta energía produce una **migración de iones**, que está influenciada por la concentración de los mismos, su movilidad y la temperatura de la disolución, y una **rotación de dipolos** o alineamiento de los momentos dipolares de las moléculas por efecto del campo eléctrico, provocando ambos fenómenos el calentamiento de la muestra sin alteración de la estructura molecular (Eskilsson y Björklund, 2000; Luque de Castro y Priego-Capote, 2011).

El calentamiento por MAE depende, tanto de la potencia aplicada, como de las propiedades dieléctricas de la muestra y medio sobre el que se aplican. La energía de microondas se encuentra en un rango de frecuencias que va desde los 300 MHz hasta los 300 GHz. En cuanto a las **propiedades dieléctricas** de las muestras, éstas están definidas por dos parámetros: la constante dieléctrica y la pérdida dieléctrica. La constante dieléctrica describe la capacidad de la molécula para ser polarizada por un campo eléctrico, mientras que la pérdida dieléctrica mide la eficiencia con la que la energía de radiación electromagnética puede ser transformada en calor. Cuando la energía de microondas penetra en una muestra, es absorbida en un rango que depende de su factor de disipación. En materiales transparentes a la energía de microondas, la penetración es considerada infinita, y cero en materiales que reflejan esta radiación. Dado que la energía es rápidamente absorbida y disipada, cuanto mayor sea el factor de disipación, menor energía de microondas a una frecuencia dada penetrará en él (Luque de Castro y Priego-Capote, 2011).

En la actualidad, los equipos de microondas comerciales usados para la obtención de extractos constan de uno o varios magnetrones y un horno en el interior del cual se colocan los vasos de extracción, generalmente alojados en una bandeja giratoria (**Figura 1.4**). Además, estos equipos suelen incluir una sonda para el control de la temperatura y,

-Introducción-

en algunos casos, una sonda para monitorizar la presión a la que se realiza la extracción (Eskilsson y Björklund, 2000).



Figura 1.4. Equipo para MAE.

El proceso de extracción por MAE comienza cargando la muestra y el disolvente en el interior de los vasos de extracción. Los parámetros generalmente evaluados en la **optimización de métodos por MAE** incluyen la composición del disolvente, el volumen del mismo, la temperatura y el tiempo de extracción y las características de la muestra, incluyendo el tamaño de partícula y su contenido en agua (Eskilsson y Björklund, 2000).

Las extracciones MAE pueden realizarse con tres tipos de **disolventes**:

- I. Sumergiendo la matriz en un disolvente o una mezcla de disolventes que absorban la energía de microondas fuertemente.
- II. Sumergiendo la matriz en una mezcla de disolventes con distintas pérdidas dieléctricas (alta y baja) mezclados en distintas proporciones.
- III. Con muestras que tengan una alta pérdida dieléctrica y disolventes transparentes a la radiación de microondas.

Por lo general, cuando se lleva a cabo una extracción asistida por microondas, la radiación se utiliza para calentar el disolvente en contacto con la muestra y así extraer los analitos de interés de la matriz. Además, al llevarse a cabo en vasos cerrados, la extracción

puede realizarse a altas temperaturas, lo que acelera la transferencia de masa de dichos analitos desde la matriz hasta el disolvente.

Una de las principales ventajas de utilizar MAE es la reducción **del tiempo de extracción** que puede ser atribuida a la eficacia del calentamiento por la energía de microondas, ya que en una extracción convencional en primer lugar se calienta el recipiente y, a continuación, el calor es transferido a la disolución, mientras que la energía de microondas calienta la solución directamente. Además, la MAE generalmente reduce el **consumo de disolvente** si la comparamos con la extracción sólido-líquido convencional, lo que hace de ella una técnica medioambientalmente más respetuosa y permite la realización de **extracciones múltiples** de forma simultánea, lo que resulta interesante para el potencial escalado de la técnica. Por lo general, una extracción MAE típica dura entre 10 y 30 min y utiliza volúmenes de disolvente entre 10 y 30 mL (Eskilsson y Björklund, 2000).

Desde la aplicación por primera vez en 1975 de un microondas doméstico para la extracción de trazas de metales a partir de muestras biológicas, los procedimientos basados en el empleo del microondas han reemplazado a los calentamientos convencionales y otras técnicas de digestión aplicadas a matrices de distinta naturaleza (medioambientales, biológicas, geológicas, etc.). Esta técnica ha sido empleada también para la extracción de contaminantes orgánicos en muestras medioambientales (López-Avila y col., 1994), de pesticidas en sedimentos y suelos marinos (López-Avila y col., 1994; López-Avila y col., 1995), de metales en suelos y sedimentos (Vázquez y col., 1997; Lorenzo y col., 1999), de antibióticos en huevos (Akhtar y col., 1997), de sulfametacina en carne de cerdo (Akhtar y col., 1997) o de ergosterol a partir de hongos (Young y col., 1995), entre otras aplicaciones.

En los últimos años, la MAE se ha empezado a aplicar para la extracción de compuestos bioactivos a partir de plantas. La extracción de betulina a partir de corteza de abedul (Ferreira y col., 2013a; Koptelova y col., 2014), la obtención de artimisina de *Artemisia annua* L. (Hao y col., 2002), la extracción de saponinas de ginseng (Kwon y col., 2003), de cocaína de hojas de la planta (Brachet y col., 2001), o de carbohidratos bioactivos a partir de brácteas de alcachofa (Ruiz-Aceituno y col., 2016), son algunos ejemplos de aplicación de esta técnica.

1.3.2. Extracción con líquidos presurizados (PLE)

La extracción con líquidos presurizados se basa en el empleo de disolventes a altas temperaturas (por encima del punto de ebullición) y presiones (entre 4 y 20 MPa) dentro de una celda de extracción donde se sitúa la muestra. Gracias a estas altas presiones, y a pesar de las elevadas temperaturas a las que es sometido el disolvente, éste se encuentra durante toda la extracción en estado líquido. Las altas temperaturas contribuyen a aumentar la velocidad de difusión, la solubilidad de los analitos y la transferencia de masa y disminuyen la viscosidad y la tensión superficial de los disolventes utilizados, factores todos ellos, que contribuyen a la transferencia de materia desde la muestra al disolvente, mejorando así el rendimiento de extracción.

La **Figura 1.5** muestra el esquema de un equipo de PLE. Como partes fundamentales, dicho equipo incluye una bomba que hará circular el disolvente (situado en un depósito contenedor) a lo largo de todo el sistema y una celda de extracción metálica. Las celdas, que pueden ser de distintos tamaños en función de la aplicación considerada, se colocan en el interior de un horno calefactor con el que se controla la temperatura a la que se va a llevar a cabo la extracción. El equipo incluye también un sistema de recogida de muestra, que permite recuperar el extracto en un vial colector. Adicionalmente, el sistema puede incluir un dispositivo refrigerante con el fin de evitar la evaporación del extracto por la caída de presión a la salida de la celda de extracción, o un circuito de nitrógeno que sirve para purgar las vías una vez finalizada la extracción. Cabe mencionar que, a lo largo del sistema, existen diferentes válvulas para poder controlar, tanto el flujo de disolvente, como la presión en el interior de la celda.

Para la extracción de productos naturales, se suele trabajar con la muestra previamente secada, triturada y tamizada. La muestra se introduce en el interior de la celda utilizando un soporte. Los soportes más frecuentemente utilizados son bolas de vidrio inertes de diferentes tamaños o arena de mar lavada. En ambos casos, el material que actúa de soporte es inerte, es decir, no interacciona con la muestra. Además de actuar como soporte, sirve también para disgregar homogéneamente la muestra en el espacio, mejorando así la relación de superficie de partícula de muestra/volumen de disolvente que lo solvata, y evitando la formación de caminos preferenciales de disolvente, dando así lugar a una extracción homogénea. Por otro lado, cuando el objetivo es extraer

compuestos de naturaleza apolar, en la celda de extracción se puede introducir algún agente desecante que retenga el agua que pueda encontrarse en alguna parte del sistema.

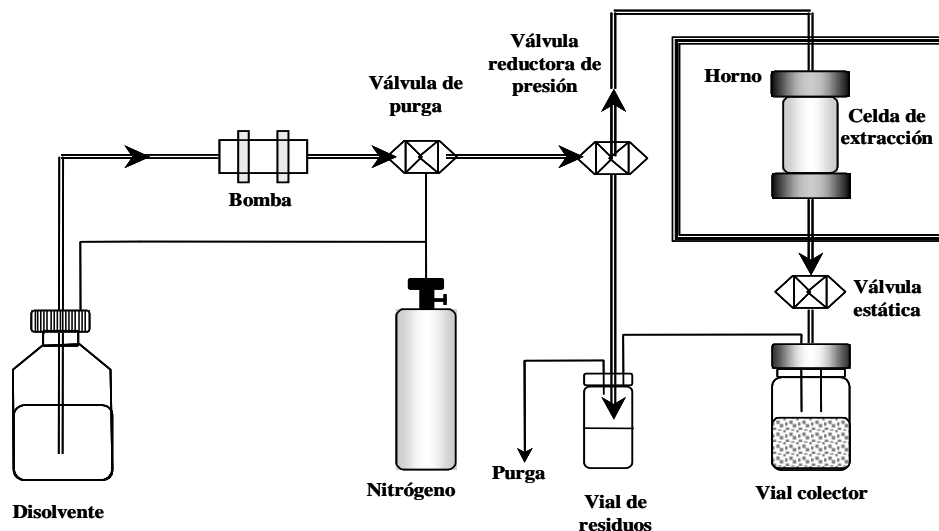


Figura 1.5. Esquema de un equipo de PLE.

Los parámetros a tener en cuenta para la **optimización del proceso de extracción** son similares a los previamente mencionados para SLE (disolvente a utilizar en función de la polaridad de los analitos, relación cantidad de muestra/volumen de disolvente, temperatura, tiempo de extracción, número de ciclos, etc.). La presión de trabajo, aunque puede también optimizarse, se ha comprobado que, superado el valor necesario para mantener el disolvente en estado líquido, no influye sobre la extracción (Richter y col., 1996), por lo que se suele trabajar a una presión fija, generalmente de 10 MPa.

Cuando la temperatura aplicada durante la PLE es superior al punto de ebullición del disolvente e inferior a la de su punto crítico, la extracción tiene lugar en condiciones subcríticas. Cabe mencionar en este punto, que las elevadas presiones y temperaturas de trabajo con esta técnica, pueden variar las propiedades físicas de los disolventes empleados. Así, cuando el disolvente empleado es agua, la elevada temperatura aplicada propicia una disminución de la constante dieléctrica, asemejándose a la del metanol o del etanol a 25°C, y una reducción de su polaridad, lo que permite la extracción de compuestos algo menos polares y/o fuertemente retenidos en la matriz que no podrían ser extraídos a presión atmosférica con este disolvente. Es lo que se conoce como extracción con agua subcrítica o sobrecalentada (SHWE) (Miller y Hawthorne, 2000). De este modo

-Introducción-

se consigue la extracción de los compuestos de interés con un disolvente más económico, seguro y respetuoso con el medioambiente, que cuando se emplean disolventes orgánicos.

Esta técnica presenta claras ventajas con respecto a las extracciones convencionales en cuanto a rapidez, utilización de menor volumen de disolvente y mayores rendimientos de extracción, pudiendo incluso automatizarse su aplicación a un relativamente elevado número de muestras (Ramos y col., 2002; Azmir y col., 2013).

Las aplicaciones descritas para esta técnica son variadas, estando en sus comienzos principalmente referidas a la obtención de extractos ricos en compuestos apolares (e.g. contaminantes) a partir de diversas matrices de interés medioambiental (e.g. suelos) (Smith, 2002; Carabias-Martínez y col., 2005), contaminantes en alimentos como pesticidas en frutas y hortalizas, metales en pescados o residuos de fármacos en alimentos (Carabias-Martínez y col., 2005; Mendiola y col., 2007). Por otra parte, se han descrito también diversas aplicaciones de la PLE para la extracción de compuestos de mayor polaridad. Así, en cuanto a la extracción de productos naturales, se han puesto a punto métodos por esta técnica para la obtención de extractos ricos en compuestos bioactivos a partir de plantas aromáticas como el orégano, el romero, el hinojo, etc. (Gámiz-García y Luque de Castro, 2000; Herrero y col., 2005; Carabias-Martínez y col., 2005; Henry y Yonker, 2006; Rodríguez-Meizoso y col., 2006), de compuestos antioxidantes a partir de frutas (Syahariza y col., 2016), así como para la obtención bioactivos de extractos de plantas medicinales como la *Angelica sinensis* (Lao y col., 2004). Se ha aplicado también esta técnica a la extracción de monosacáridos y polialcoholes a partir de maderas utilizadas para el envejecimiento del vino (Alañón y col., 2009) y a la de carbohidratos bioactivos a partir de residuos de diversas plantas (Rodríguez-Sánchez y col., 2016) o residuos de alcachofa (Ruiz-Aceituno y col., 2016), entre otras aplicaciones.

1.3.3. Extracción asistida por ultrasonidos (UAE)

Los ultrasonidos son ondas acústicas con una frecuencia por encima de la capacidad de audición del oído humano. Sus aplicaciones pueden dividirse en ultrasonidos de señal y de potencia. Los **US de señal (100 kHz a 1 MHz)** son de baja intensidad y se utilizan para llevar a cabo medidas fisicoquímicas en alimentos o en seres vivos, como, por ejemplo, medir el grosor de la cáscara de huevos, el grosor del caparazón de algunos animales, etc. (Mulet y col., 1999). Los **US de potencia (18-100 KHz)** producen cambios físicos en el medio en el que inciden. Cuando los US son aplicados a un medio líquido, tiene lugar la generación y subsiguiente colapso de burbujas de cavitación, las cuales aparecen, crecen y eclosionan dentro del líquido (Mulet y col., 2003). Todo líquido tiene un punto de presión de vapor, que es la presión en la que las fases líquida y gaseosa se encuentran en equilibrio termodinámico a una temperatura determinada. Lo que sucede al aplicar los US es que las ondas sonoras propagadas por el medio, generan ciclos fluctuantes de alta y baja presión. Durante el ciclo de baja presión, las ondas ultrasónicas de alta intensidad crean pequeñas burbujas que van aumentando de tamaño hasta alcanzar un volumen en el que ya no pueden absorber más energía y colapsan de forma violenta durante un ciclo de alta presión. Esta implosión provoca un aumento local de la temperatura (de aprox. 5000 K) y de la presión (de aprox. 1000 atm) y genera además la propulsión de corrientes de líquido a una velocidad de hasta $280 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ (**Figura 1.6**; Suslick, 1998).

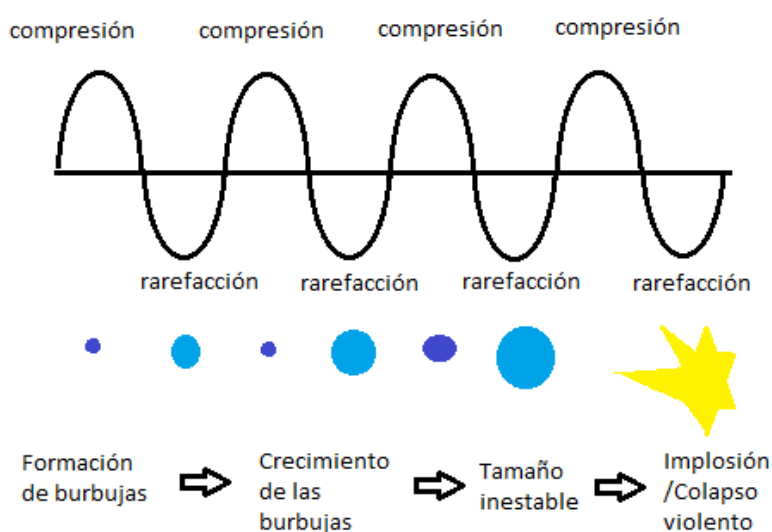


Figura 1.6. Cavitación ultrasónica en UAE.

-Introducción-

Como se ha comentado anteriormente, los procesos de extracción tienen una importancia fundamental en diversos campos y, entre las distintas alternativas posibles, se encuentra la aplicación de ultrasonidos para la extracción de compuestos de alto valor añadido a partir de fuentes vegetales (Soria y Villamiel, 2010). La cavitación en una zona límite líquido-sólido (disolvente-muestra) produce flujos rápidos del líquido que provocan cambios físicos en el sólido, lo que resulta en el desgaste superficial, erosión y desintegración de partículas, que facilita la extracción de los compuestos de interés (Mason y Lorimer, 2002). Por tanto, el mecanismo de UAE consiste en dos tipos de fenómenos físicos: la difusión a través de la pared celular de la muestra vegetal y el posterior lavado de los contenidos celulares, una vez la pared se ha roto. Los US además facilitan la rehidratación del tejido vegetal cuando se utilizan matrices secas al abrir los poros, lo cual a su vez incrementa el transporte de masa de los constituyentes solubles por difusión y procesos osmóticos (Vinatoru, 2001).

Los procesos de extracción asistida por ultrasonidos proporcionan beneficios económicos y tecnológicos debidos al acortamiento del proceso de extracción (sin repercusiones negativas sobre las propiedades de los componentes extraídos) (Brennan, 2006; Sun, 2006), al aumento de la eficacia y a la disminución en el consumo de disolvente, lo que da lugar a metodologías medioambientalmente respetuosas (Dolatowski y Stasiak, 2011).

Los equipos que se utilizan para UAE pueden ser **sondas** y **baños** (**Figura 1.7**) (Mason y Lorimer, 2002). Las diferencias entre ambos se basan en el tipo de transductores y en la forma de aplicación de los US. Una difusión efectiva asistida por ultrasonidos requiere el control de parámetros como:

- ✓ La densidad de la energía, que se mide en $W \cdot dm^{-3}$, que es la energía por unidad de volumen.
- ✓ Intensidad de la fuente de ultrasonidos, medida en $W \cdot cm^{-2}$, que es la potencia emitida por el transductor por unidad de superficie.
- ✓ Presión estática, que determina la cavitación y su intensidad; la influencia de la cavitación en varios medios es mucho más intensa a altas presiones.
- ✓ Temperatura, que afecta a la intensidad de cavitación; a mayor temperatura, la implosión de las burbujas de cavitación es más débil. Al mismo tiempo, altas temperaturas ayudan al intercambio de masas por convección.

-Introducción-

- ✓ Viscosidad, que influye también en la cavitación, ya que una mayor viscosidad del medio dificulta el proceso de creación de burbujas y la transferencia de masa.

Los equipos de tipo baño, son los más comunes. En ellos, la energía de ultrasonidos es directamente emitida desde la base del baño hasta el vial que contiene la muestra. Un baño estándar crea campos de baja y media intensidad para evitar una erosión excesiva en las paredes del baño, de forma que la densidad de ultrasonidos es baja. A pesar de estas limitaciones, el baño de ultrasonidos es utilizado en muchos laboratorios e industrias, debido a su universalidad (Povey y Mason, 1998).

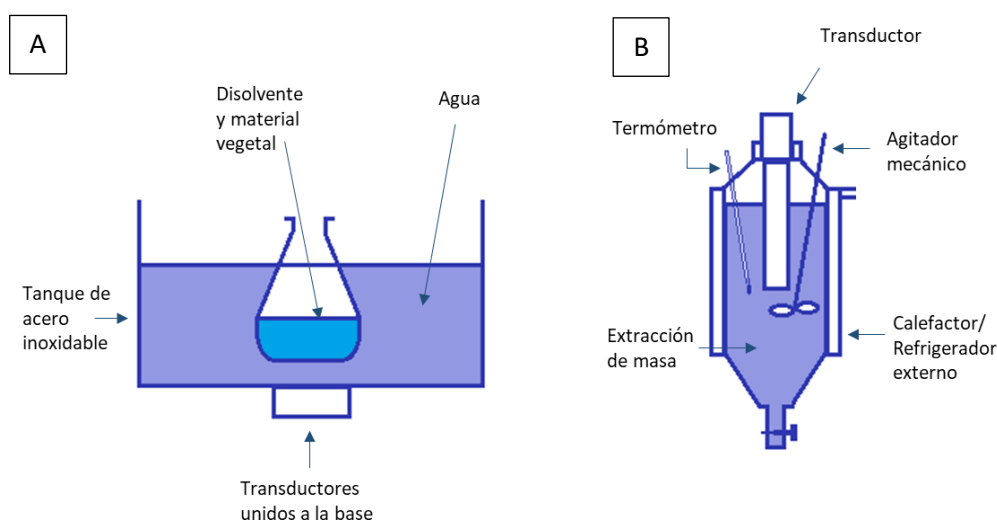


Figura 1.7. Baño (A) y sonda (B) de UAE.

Cuando se utiliza una sonda de UAE, esta se sumerge directamente en el líquido que contiene la muestra, por lo que la intensidad obtenida es mucho mayor. Estas sondas pueden aplicarse a pequeños volúmenes, dando así lugar a procesos de extracción miniaturizados. Debido a la alta potencia de la fuente y a la limitada disipación de energía, existe un intenso calentamiento de la muestra en la zona cercana al emisor. El control de la temperatura del proceso es el principal problema del uso de este equipo para extracciones de material biológico o de compuestos bioactivos, puesto que una temperatura excesiva y/o no controlada con precisión puede dar lugar a cambios indeseados en las propiedades físico-químicas, bioactivas, etc. de la sustancia/s extraídas. La erosión cavitacional que se produce sobre la superficie del emisor, así como el riesgo

de contaminación son, en menor medida, factores a considerar en la aplicación de esta técnica (Dolatowski y Stasiak, 2011).

El resultado del proceso de intercambio de masas asistida por US depende, por un lado, del área de interfase sólido-líquido, del gradiente de concentración, y del coeficiente de transferencia de masa y, por otro, de los parámetros de ultrasonicación. Algunos equipos de UAE permiten controlar la potencia de US, la temperatura del material procesado, la duración del proceso y la frecuencia empleada para incrementar la eficiencia de cavitación. Estos serían algunos de los parámetros más relevantes a considerar en la optimización de un método MAE en función de la aplicación elegida.

Los ultrasonidos se han utilizado extensamente para la extracción de compuestos bioactivos a partir de diversas muestras vegetales. Entre otras, se ha empleado para la extracción de aceites ricos en ácidos grasos como el aceite de oliva (Jiménez y col., 2007), el aceite de lino (Zhang y col., 2008) o para la extracción de aceite de semillas de crambe, por su potencial uso para la síntesis de biodiésel (Tavares y col., 2017), para la extracción de polifenoles de diversas fuentes como cítricos (Khan y col., 2010) o bayas (Machado y col., 2017), de xantofilas de caléndula (Gao y col., 2009), de antocianinas de zanahoria negra (Agcam y col., 2017) o de frambuesa (Chen y col., 2007), de curcumina de rizomas de Cúrcuma (Shirsath y col., 2017), de capsaicinoides de *Capsicum frutescens* (Boonkird y col., 2008), de polisacáridos de hojas de *Rhododendron aganniphyn* (Guo y col., 2017), etc. En general, todas estas metodologías han demostrado ser mucho más rápidas y más eficaces (mayores rendimientos de extracción de los compuestos de interés y/o mayor actividad de los extractos) que sus equivalentes basadas en extracciones sólido-líquido convencionales.

Por último, es necesario reseñar que la selección de una u otra de estas técnicas avanzadas de extracción, así como de sus condiciones de operación o modalidad, condiciona en gran medida la composición de los extractos (Castro-López y col., 2017). Por ello, resulta de gran interés, tanto científico como aplicado, la comparación de los resultados obtenidos mediante distintas técnicas, una vez se han optimizado los parámetros de operación para cada una de ellas en función de la matriz y los analitos de interés.

1.4. ANÁLISIS DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

Para que un extracto pueda ser empleado como ingrediente funcional, nutracéutico, etc. es fundamental que, además de llevarse a cabo la evaluación de su actividad biológica, se caracterice de la forma más exhaustiva posible su composición, tanto en los compuestos a los que se asocia su bioactividad, como en otros que pudieran coextraerse y ser incluso interferentes en dicha bioactividad. Por tanto, el análisis cuali- y cuantitativo de la composición de extractos obtenidos a partir de fuentes naturales resulta esencial, ya que no sólo permite determinar sus componentes, asegurando así su calidad y seguridad, sino también establecer relaciones entre las estructuras químicas de los compuestos determinados y sus diversas propiedades bioactivas.

La gran variedad de compuestos de distintas familias presentes en forma de mezclas complejas en los extractos vegetales, la mayor parte de las veces en bajas concentraciones, hace necesario el uso de técnicas instrumentales de alto poder de resolución, eficaces, sensibles, etc. para su análisis, como son las técnicas cromatográficas: cromatografía de gases (GC) y cromatografía de líquidos (LC o HPLC). Además, el acoplamiento de dichas técnicas a la espectrometría de masas (MS) proporciona una información cualitativa adicional (espectro de masas) a la retención cromatográfica, de gran utilidad para aumentar el grado de certeza en las identificaciones, convirtiendo así a estos acoplamientos (GC-MS y LC-MS) en las técnicas analíticas de elección en la actualidad para el análisis de extractos naturales con propiedades bioactivas. La elección de una u otra de estas técnicas vendrá condicionada por las características propias de cada compuesto tales como su peso molecular, volatilidad, polaridad, etc.

1.4.1. Cromatografía de gases (GC)

La GC se emplea principalmente para el análisis tanto cuali- como cuantitativo de mezclas complejas de compuestos volátiles o semivolátiles, previo aislamiento de dichos compuestos de su matriz no volátil. Como ya se ha mencionado previamente, la elección de una u otra de estas técnicas de aislamiento viene determinada por las características de la muestra, así como de los analitos a determinar. En el caso de los compuestos de mayor volatilidad, las técnicas generalmente empleadas para su análisis son las basadas en la destilación, comentadas en la sección 1.3, o las basadas en el análisis del espacio de cabeza (*Headspace*, HS), por ser ventajosas en cuanto a permitir el desarrollo de

metodologías sencillas, limpias (no requieren el uso de disolventes orgánicos) y económicas. Existen, además, diversas modalidades (HS estático, HS dinámico, HS en múltiples etapas, etc.) lo que permite dar respuesta a los distintos requerimientos del análisis (por ejemplo, en cuanto a sensibilidad) en función de la aplicación elegida y sin aumentar en exceso la complejidad de la instrumentación empleada. En el Anexo I de esta Memoria se recoge el artículo de revisión titulado “Volatile sampling by headspace techniques” de A.C. Soria, M.J. García-Sarrió y M.L. Sanz, publicado en la revista *Trends in Analytical Chemistry* 71 (2015) 85-99, que incluye una revisión actual y exhaustiva sobre las técnicas de HS. En dicho Anexo, además de describirse los fundamentos y los avances más relevantes en cuanto a instrumentación, se incluye una discusión detallada de los parámetros operacionales más importantes que condicionan los resultados y se describen algunas de las aplicaciones más reseñables, clasificadas en base al tipo de matriz (productos farmacéuticos, alimentos, muestras medioambientales y biológicas, entre otras).

Otras técnicas muy empleadas en la actualidad dada su versatilidad, y en las que se aúna el aislamiento de compuestos volátiles por HS y su preconcentración previa al análisis por GC-MS incluyen, entre otras, la microextracción en fase sólida (SPME), en la que se puede modular la selectividad de los analitos extraídos en función de la fibra de SPME elegida (Souza-Silva y col., 2013; 2015; Xu y col., 2016; Sajid y col., 2019), o la desorción térmica directa (DTD) que, acoplada en línea a GC-MS, permite el análisis automatizado de muy pequeñas cantidades de muestra con adecuados niveles de sensibilidad (Lebrón-Aguilar y col., 2016).

Por otra parte, y en su aplicación a analitos de volatilidad media-baja, las técnicas de extracción basadas en el uso de disolventes (ver Sección 1.3) son las generalmente elegidas, posibilitando el análisis directo del extracto por GC-MS, siempre y cuando el disolvente extractante no sea acuoso. Sin embargo, es necesario considerar también que los extractos obtenidos por estas técnicas pueden incluir compuestos que presenten limitaciones en cuanto a volatilidad o estabilidad térmica para su análisis por GC-MS, siendo necesaria en estos casos una **derivatización** de los mismos previa a su análisis cromatográfico. Así, en el caso de compuestos de alta polaridad, la derivatización tiene como objetivo sustituir grupos polares como -OH, -SH o -NH, para evitar la formación de puentes de hidrógeno entre las moléculas, aumentando así su volatilidad, mientras que

-Introducción-

cuando los analitos son termolábiles, la derivatización se aplica para mejorar su estabilidad, incrementando así la respuesta cromatográfica.

Las reacciones de derivatización más comunes son la alquilación, acetilación y sililación. De entre todas ellas, la sililación, y en concreto la trimetilsililación, es la reacción más empleada debido a la sencillez del procedimiento, la estabilidad y volatilidad de los derivados y la eficacia de la reacción. En estos derivados, los hidrógenos activos de las moléculas son sustituidos por grupos trimetilsilil (TMS) para formar los correspondientes éteres. Para la obtención de estos derivados, se disuelve en primer lugar la muestra, previamente evaporada a sequedad, en disolventes no próticos, como piridina o dimetil sulfóxido, y se emplean reactivos sililantes tales como hexametildisilazano (HMDS), trimetilclorosilano (TMCS), trimetilsililimidazol (TMSI), bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) (Sanz y Martínez-Castro, 2007), o combinaciones de los mismos. La temperatura de la reacción varía entre los 25 °C y 45 °C y, por lo general, la reacción se produce de forma instantánea, aunque algunos autores proponen tiempos de reacción superiores (15-30 min) para la completa formación de los derivados (Knapp, 1979).

Por otra parte, y cuando se trata del análisis de extractos de fuentes naturales, otro aspecto a considerar a la hora de seleccionar el tipo de derivado es la presencia, aún en bajas concentraciones, de carbohidratos de bajo peso molecular (LMWC) como glucosa, fructosa, sacarosa, etc. La sililación, en el caso de carbohidratos reductores como glucosa y fructosa, puede dar lugar hasta 5 señales cromatográficas diferentes, correspondientes a las cinco formas tautoméricas (α - y β -furanosa, α - y β -piranosa y cadena abierta) de estos carbohidratos en disolución. Este hecho dificulta en gran medida el análisis de los correspondientes extractos en los que se encuentran presentes y que, por lo general, son mezclas complejas que incluyen un elevado número de compuestos en distinta proporción. Una forma de simplificar estos análisis es llevar a cabo una derivatización en dos etapas que incluya una primera etapa de oximación del grupo carbonilo, seguida de la sililación, dando lugar así a trimetilsilil oximas (TMSO) derivados. De esta forma se reduce a dos (isómeros *E*- y *Z*-) el número de señales cromatográficas correspondientes a carbohidratos reductores, simplificando así el perfil cromatográfico y facilitando el análisis simultáneo de estos y otros compuestos presentes en extractos naturales (Rodríguez-Sánchez y col., 2011) (**Figura 1.8**).

-Introducción-

Durante la última década, se han comenzado a comercializar también columnas basadas en el empleo de líquidos iónicos (ILs) como fases estacionarias y cuya aplicación ha suscitado un gran interés, ya que poseen propiedades físico-químicas únicas que les confieren una selectividad diferente a la de las fases estacionarias convencionales, pudiendo ser de gran utilidad para la resolución de mezclas complejas en diversos campos de aplicación (Rodríguez-Sánchez y col., 2014; Ros y col., 2018).

En cuanto a las dimensiones de las columnas de GC, que determinan tanto la retención como la resolución de los analitos, cabe decir que las más utilizadas en la actualidad son las capilares con una longitud que varía generalmente entre los 10 y los 30 m, un diámetro interno entre los 0,1 y 0,32 mm y un espesor de fase entre 0,1-0,25 μm .

Respecto a los detectores de GC, uno de los más utilizados por su universalidad, facilidad de uso y sensibilidad es el detector de ionización de llama (FID). Sin embargo, presenta como limitación el que la información proporcionada (datos de retención) resulta muy limitada para la identificación inequívoca de compuestos, incluso cuando se dispone de patrones. En este sentido, la información estructural adicional (espectro de masas), proporcionada por el detector de espectrometría de masas, supone un avance en cuanto al grado de certeza en las identificaciones, lo que ha contribuido a hacer de la GC-MS la técnica de elección para el análisis cualitativo de mezclas complejas.

En GC-MS, dependiendo de la fuente de ionización utilizada, se consigue mayor o menor fragmentación de la molécula, pudiéndose determinar el peso molecular del compuesto cuando la ionización es suave (ionización química, CI), u obtener información sobre la estructura cuando la ionización es dura, por impacto electrónico (EI). La información estructural proporcionada por el sistema también depende del analizador empleado. Los más frecuentemente utilizados son los cuadrupolares (Q), aunque otros analizadores como las trampas iónicas (IT), los triples cuadrupolos (QqQ), etc. permiten la adquisición de espectros mediante la configuración de espectrometría de masas en tándem (MS^n).

Las aplicaciones de la GC y GC-MS para el análisis de mezclas complejas en el campo de los alimentos, así como para la caracterización de compuestos bioactivos en extractos vegetales, entre otras aplicaciones, son muy numerosas (Ibáñez y Cifuentes,

2001; Montero y col., 2004). Así, y a modo de ejemplo, se han puesto a punto y aplicado métodos basados en estas técnicas para la identificación de alcoholes, ésteres, ácidos grasos y cetonas en hojas de *Vernonia amygdalina* (Alara y col., 2019); carbohidratos (inositoles e inulina) y compuestos fenólicos con distintas propiedades bioactivas en extractos MAE y PLE de hojas de alcachofa (Ruiz-Aceituno y col., 2016), iminoazúcares en extractos PLE de hojas de morera y aglaonema (Rodríguez-Sánchez y col., 2013; 2016), inositoles y glicosilinositoles en extractos MAE de judía munga (Carrero-Carralero y col., 2018), etc. Se ha empleado también la GC-MS para la detección e identificación de terpenoides (carvacrol, *trans*-sabineno, borneol y linalool) en extractos de orégano con actividad antimicrobiana (Santoyo y col., 2006), para el análisis de compuestos antioxidantes en plantas aromáticas (orégano, albahaca y tomillo) (Bozin y col., 2006) y para el de otros compuestos con potencial actividad antifúngica, insecticida, etc. en aceites esenciales de *Mentha spicata* (Kedia y col., 2014).

1.4.2. Cromatografía de líquidos (HPLC o LC)

La cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) es la técnica más empleada para la caracterización de compuestos polares y de alto peso molecular, por su relativamente alto poder de resolución y gran versatilidad. Además, los distintos modos de operación en HPLC (cromatografía en fase inversa (RPLC), cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC), cromatografía de intercambio iónico (IEC), etc.), proporcionan múltiples posibilidades, de acuerdo a la finalidad pretendida, en la separación de mezclas complejas.

Por otra parte, si bien la mayoría de metodologías basadas en HPLC no requieren una derivatización previa de los analitos, en algunos casos como cuando se pretende favorecer la retención de compuestos con baja afinidad por la fase estacionaria o para permitir la detección mediante detectores ópticos (UV-Vis, fluorescencia, etc.) de compuestos carentes de grupos cromóforos o fluoróforos, es recomendable o incluso imprescindible su derivatización (Danielson y Gallagher, 2000).

El desarrollo de un método por HPLC implica, en primer lugar, la selección del modo de operación y del sistema de detección en función de las características de los analitos de interés, pues de ellos dependen muchos otros parámetros experimentales (columna, composición de la fase móvil, etc.) que también han de evaluarse.

-Introducción-

De entre los distintos modos de HPLC, la **RPLC** es el más frecuentemente utilizado para el análisis de extractos vegetales ricos en compuestos bioactivos. En RPLC se emplean fases estacionarias no polares, normalmente basadas en partículas de sílice modificadas con hidrocarburos de cadena larga, siendo las más comunes las modificadas con cadenas de 18 u 8 átomos de carbono (columnas C18 y C8, respectivamente). La fase móvil, de mayor polaridad, suele consistir en mezclas de agua con modificadores orgánicos (acetonitrilo, metanol, etc.), y su composición va incrementando el contenido en dicho modificador a medida que avanza el gradiente. El mecanismo de retención se basa en interacciones hidrofóbicas de los analitos con la fase estacionaria de la columna, lo que va a depender tanto de la naturaleza de los analitos, como de las fases móviles empleadas. El uso de distintos aditivos iónicos (ácido fórmico, ácido acético, etc.) en la fase móvil permite controlar el pH y la fuerza iónica de la fase móvil, lo que también da lugar a pequeños cambios en la retención.

En HPLC existen distintos sistemas de detección: índice de refracción (IR), absorción UV-Vis, fluorescencia, espectrometría de masas, amperometría de pulsos (PAD), dispersión de luz (LSD), etc. De entre ellos, los más utilizados en su aplicación al análisis de alimentos y extractos bioactivos, son los detectores de absorción UV-Vis y MS, así como las combinaciones en serie de ambos.

Si bien la falta de grupos cromóforos/fluoróforos en algunos compuestos bioactivos de interés puede solventarse mediante la requerida derivatización pre- o post-columna de estos compuestos, la mayor manipulación de la muestra que conlleva una mayor complejidad de análisis, ha hecho que hoy en día sean los acoplamientos LC-MS y LC-MSⁿ los más empleados como método universal y sensible para su caracterización (Abu-Reidah y col., 2017; Leyva-Jiménez y col., 2018; Nabet y col., 2019). Además, las distintas configuraciones existentes para este tipo de acoplamientos, tanto en cuanto a fuentes de ionización (electrospray (ESI), ionización química a presión atmosférica (APCI), etc.), como a analizadores simples e híbridos (Q, IT, QqQ, Q ToF, etc.), permiten su aplicación para la caracterización estructural de compuestos de distinta naturaleza.

La LC o LC-MS se ha empleado en la determinación de una gran variedad de compuestos incluyendo biomarcadores, nucleósidos, nucleótidos, aminoácidos, péptidos y proteínas, glicósidos, oligosacáridos, fármacos hidrofílicos, alcaloides, carbohidratos, etc. en muestras de distinta naturaleza. En el campo del análisis de extractos de productos

naturales, y a modo de ejemplo, se han analizado por HPLC con detector de array de diodos (HPLC-DAD) y por HPLC-MS compuestos fenólicos (glicósidos de catequina y epicatequina, procianidinas, etc.) con propiedades antioxidantes, antilipasa y antiglicosidasa extraídos de lentejas (Zhang y col., 2015). Se han analizado también por HILIC con detector de fotodiodo array antocianinas en diversas plantas y frutas (Willemse y col., 2013) e iminoazúcares bioactivos en extractos de hoja de *Aglaonema* utilizando detección de masas (Rodríguez-Sánchez y col., 2015), y se han determinado diversos compuestos fenólicos como ácido ferúlico, quercetina, apigenina y luoteolina en extractos de tomillo y *M. pulegium*, mediante RP-HPLC-UV (Proestos y col., 2005).

1.4.3. Técnicas cromatográficas multidimensionales

Si bien tanto la GC como la LC, y sus acoplamientos a espectrometría de masas (GC-MS y LC-MS), son las técnicas generalmente empleadas para la caracterización de mezclas de productos naturales, la complejidad en cuanto a composición de estas muestras da lugar a frecuentes coeluciones, imposibles de resolver mediante técnicas cromatográficas monodimensionales, incluso cuando se optimizan dichas metodologías. Es en estos casos, cuando el desarrollo y aplicación de metodologías basadas en el empleo de técnicas cromatográficas bidimensionales completas (GC×GC o LC×LC) puede aportar ventajas en cuanto a resolución y sensibilidad para su análisis.

En cromatografía bidimensional completa, dos columnas se conectan en serie a través de una interfase o modulador, de tal forma que la totalidad de los compuestos que eluyen de la primera columna (primera dimensión, ¹D) son transferidos (previo enfoque en el modulador) a la segunda dimensión (²D) para su separación adicional. De esta forma, todos los componentes de la muestra se ven sometidos a dos procesos de separación. Es importante señalar que la separación debe ser lo más ortogonal posible, es decir, que los mecanismos de retención deben ser lo más diferentes posible en ambas dimensiones. En el caso de GC×GC, suelen emplearse para ello columnas de distinta polaridad, mientras que en LC×LC, las columnas suelen ser de dos modos de operación distintos, aunque compatibles. Además, el proceso de modulación en el que se recoge, enfoca y transfiere periódicamente la muestra de ¹D a ²D, da lugar también a un aumento de la sensibilidad, lo que puede permitir la detección de compuestos minoritarios indetectables por 1D GC o 1D LC. Dado que tanto la separación de analitos en ²D como

la adquisición de datos deben ser rápidas, la rapidez de respuesta de los detectores empleados en los acoplamientos bidimensionales debe ser alta y su volumen interno reducido. Por ello, en GC×GC suelen emplearse los detectores FID o ToF MS, mientras que los PDA o QToF MS son los más ampliamente utilizados en LC×LC (Brokl y col., 2009; Martín-Ortiz y col., 2019).

Las aplicaciones de las técnicas cromatográficas bidimensionales son cada vez más comunes tanto en el campo del análisis de alimentos como de productos naturales. Así, y a modo de ejemplo, se han puesto a punto metodologías basadas en GC×GC-ToF MS para la evaluación en diversos simulantes alimentarios de la migración de compuestos semivolátiles procedentes de envases alimentarios (Carrero-Carralero y col., 2019), para el análisis de contaminantes en miel (Rivellino y col., 2013), o para la caracterización de compuestos volátiles en vinos (Weldegergis y col., 2011). En cuanto a la LC×LC, se ha descrito la optimización y puesta a punto de diversos métodos para el análisis de procianidinas en cacao (Kalili y de Villiers, 2013), para el análisis de polifenoles en rooibos (*Aspalathus linearis*) (Beelders y col., 2012) o en vino (Rigano y col., 2016), así como para el análisis de mezclas comerciales de oligosacáridos con carácter prebiótico (Martín-Ortiz y col., 2019).

Por último, es necesario mencionar que, dada la diversidad de compuestos que suelen encontrarse en alimentos y extractos vegetales, así como en sus productos derivados, son cada vez más comunes las **aproximaciones multianalíticas**, en las que la información proporcionada por diversas técnicas se combina con el fin de obtener una caracterización lo más exhaustiva posible de la muestra en estudio (Proestos y col., 2006; Ballesteros-Vivas y col., 2019a, 2019b). En este sentido, y a pesar del potencial de las plataformas analíticas actualmente disponibles, la aplicación de estas aproximaciones a muestras de gran complejidad como los extractos vegetales, cuenta todavía con limitaciones, principalmente relacionadas con la identificación inequívoca de compuestos estructuralmente similares y que no siempre comparten propiedades bioactivas, la falta de bibliotecas, etc. En estos casos, la interpretación cuidadosa de los datos analíticos, así como el establecimiento de relaciones composición-bioactividad son los retos a los que el químico analítico debe hacer frente.

OBJETIVOS, METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO

2. OBJETIVOS, METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO

Objetivos

La elevada incidencia actual en los países desarrollados de diversas enfermedades como la obesidad o el cáncer entre otras, ha fomentado la concienciación social por el cuidado de la salud humana y su relación con la alimentación. En este sentido, en los últimos años ha cobrado un gran auge el desarrollo de alimentos funcionales que, además de satisfacer las necesidades nutricionales básicas, contribuyen a promover un mejor estado de salud. Por otra parte, está despertando un interés cada vez mayor el consumo de nutraceuticos, en especial de aquéllos orientados a la prevención de la obesidad, que son generalmente percibidos por el consumidor como un complemento beneficioso a una dieta saludable y ejercicio físico moderado para el cuidado de su salud. Por último, y en línea con la prioridad actual en cuanto a desarrollo sostenible, la búsqueda de nuevos conservantes alimentarios y/o biocidas naturales que reemplacen a los equivalentes sintéticos, minimizando el impacto ambiental y con menores efectos adversos sobre la salud, se ha convertido en otro de los ámbitos de interés tanto en el sector alimentario como en el de la agricultura.

El reino vegetal constituye una enorme reserva de compuestos biológicamente activos con distintas estructuras químicas (terpenoides, polifenoles, etc.) y propiedades bioactivas (antioxidantes, antibacterianas, etc.) que pueden ser explotadas en la elaboración de alimentos funcionales, nutraceuticos, cosméticos o fármacos, entre otras aplicaciones. Además, el origen natural de estos compuestos bioactivos o de sus productos derivados (extractos, aceites esenciales, etc.) es percibido por parte del consumidor como un valor añadido que promueve su consumo. Si además estos valiosos compuestos pueden obtenerse a partir de residuos o subproductos de la actividad industrial (alimentaria, maderera, etc.), esta finalidad cobra un mayor interés, dada su contribución a la denominada economía circular.

A pesar de que, como se ha comentado previamente, son claras las ventajas del aprovechamiento de estos recursos naturales para la obtención de extractos ricos en compuestos bioactivos, es todavía necesario el **desarrollo de metodologías analíticas avanzadas** que permitan tanto la obtención de dichos extractos como su caracterización exhaustiva. En este sentido, el empleo de técnicas de extracción avanzadas, ventajosas en cuanto a eficacia y respetuosas con el medioambiente, así como de aproximaciones

multianalíticas basadas en técnicas cromatográficas y su acoplamiento a espectrometría de masas, resulta de gran interés tanto a nivel científico como aplicado.

En base a lo arriba expuesto, el **objetivo general** de esta Tesis Doctoral ha sido el desarrollo de métodos de obtención y análisis de extractos multifuncionales (con propiedades antioxidantes, anti-lipasa, antimicrobianas) a partir de muestras de origen vegetal (corteza de abedul y hojas de menta). Esta investigación estaría contemplada dentro del proyecto “Avances metodológicos para la obtención de biocidas naturales de uso alimentario basados en extractos de *Mentha* sp.” (CIVP17A2843) financiado por la Fundación Ramón Areces y del proyecto “Estrategias avanzadas para la mejora y el control de la calidad y la seguridad” (S2013/ABI-3028, AVANSECAL-CM) financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad.

Partiendo de este objetivo general, se plantearon los siguientes **objetivos parciales**:

- Desarrollar metodologías avanzadas de extracción mediante MAE, PLE y UAE, para la obtención de extractos multifuncionales a partir de hojas de menta y corteza de abedul. Aplicación de los métodos desarrollados a diferentes muestras.
- Determinar propiedades bioactivas (antioxidante, antimicrobiana o antilipasa) de los extractos obtenidos. Evaluar la seguridad de dichos extractos mediante ensayos *in vitro* de viabilidad celular y la estabilidad de los compuestos bioactivos durante el almacenamiento.
- Analizar la composición de dichos extractos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) (terpenoides bioactivos en extractos de menta y de corteza de abedul) o cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS y HPLC-QToF MS) (composición fenólica en extractos de menta).

Metodología y plan de trabajo

Para alcanzar los objetivos parciales mencionados, se planteó un plan de trabajo que incluía dos grandes bloques: (i) Aprovechamiento de residuos de la industria maderera para la obtención de extractos multifuncionales (con actividad anti-lipasa y antioxidante) de corteza de abedul: obtención y caracterización analítica (resultados presentados en la **Sección 3** de esta Memoria), y (ii) Extractos multifuncionales (antioxidantes y antimicrobianos) de hojas de *Mentha* sp. como nuevos ingredientes multifuncionales y/o conservantes alimentarios: métodos avanzados de extracción y caracterización multianalítica (**Sección 4**).

A continuación, se detalla la metodología seguida en cada una de las Secciones previamente comentadas:

Sección 3. Desarrollo de un nuevo método asistido por microondas para la obtención de extractos multifuncionales de corteza de abedul (*Betula pendula*).

- Optimización del disolvente de extracción y de la relación cantidad de muestra/volumen de disolvente.
- Optimización de los parámetros más relevantes que afectan a la extracción asistida por microondas.
- Optimización del número de ciclos de extracción.
- Análisis por GC-MS de los extractos obtenidos.
- Medida del contenido en polifenoles totales.
- Medida de la actividad antioxidante.
- Medida de la actividad antilipasa.
- Evaluación de la viabilidad celular.
- Medida de la estabilidad de los extractos en condiciones controladas de almacenamiento.
- Estudio del tratamiento de los extractos con levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*).
- Aplicación del método óptimo a distintas muestras de corteza de abedul.

Sección 4. Desarrollo de nuevos métodos de extracción de compuestos bioactivos a partir de hojas de *Mentha* sp.

- Selección del disolvente óptimo de extracción.
- Obtención de extractos etanólicos multifuncionales a partir de hojas de menta:
 - Comparación de técnicas de extracción para la obtención de terpenoides a partir de hojas de *M. rotundifolia*: extracción sólido-líquido (SLE), extracción asistida por ultrasonidos (UAE) y extracción asistida por microondas (MAE). Selección de la técnica óptima.
 - Optimización de los parámetros MAE más relevantes que afectan a la composición y bioactividad de los extractos.
 - Evaluación de diferentes procesos de enriquecimiento en terpenoides de los extractos obtenidos por MAE: Extracción en fase sólida (SPE) y tratamiento con carbón activo (AC).
 - Aplicación del método MAE óptimo a muestras de *M. rotundifolia* de distintos años de cosecha.
- Obtención de extractos acuosos multifuncionales a partir de hojas de menta.
 - Comparación entre distintas técnicas avanzadas de extracción: MAE, PLE y UAE.
 - Optimización de los parámetros más relevantes que afectan a la MAE.
 - Optimización de los parámetros más relevantes que afectan a la extracción con líquidos presurizados (PLE).
 - Comparación MAE y PLE para la obtención de extractos acuosos multifuncionales.
 - Aplicación del método MAE optimizado a distintas especies de menta.
 - Análisis cualitativo y cuantitativo de compuestos fenólicos en extractos MAE de menta.
 - Evaluación del contenido en polifenoles totales (TPC), de la actividad antioxidante y de la actividad antimicrobiana de los extractos MAE obtenidos.
 - Aplicación del método óptimo a distintas especies de menta.

EXTRACTOS MULTIFUNCIONALES DE CORTEZA DE ABEDUL

3. DESARROLLO DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS PARA LA OBTENCIÓN DE EXTRACTOS MULTIFUNCIONALES DE CORTEZA DE ABEDUL (*Betula pendula*)

3.1. PREFACIO

3.1.1. Descripción, distribución y usos

Betula L. es un género de árboles perteneciente a la familia Betulaceae y al orden Fagales que incluye distintas especies, entre ellas, *Betula pendula*, *Betula papyrifera*, *Betula populifolia* (o abedul gris), *Betula pubescens*, *Betula alleghaniensis* (o abedul amarillo), *Betula platyphylla*, etc.

Los abedules son árboles caducifolios de entre 10 y 30 metros de altura, muy esbeltos, de copa alargada, con ramas flexibles y su corteza es blanquecina. Sus hojas son simples, serradas y romboidales de 3 a 6 cm, variando ligeramente según la especie. Son especies diclino monoicas, es decir, el mismo árbol posee flores masculinas y femeninas, con amentos amarillos o verdes. Su hábitat requiere zonas soleadas, suelos ácidos y silíceos que posean suficiente humedad. Se distribuyen en una amplia zona del hemisferio norte: en Europa, principalmente en los países nórdicos donde forman grandes bosques, en parte de Asia, América del Norte y el norte de África (Ashburner y McAllister, 2013).

La *Betula pendula* o abedul común (**Figura 3.1**), originario de Euroasia, es la especie más extendida en Europa, si bien en la parte más meridional únicamente se encuentra en las zonas de mayor altura (Rastogi y col., 2015). En la Península Ibérica habita en los Pirineos, el Sistema Central y el Sistema Ibérico, los Montes de Toledo y las Sierras Bética y Penibética. Su tronco es generalmente delgado (aunque en ocasiones puede llegar hasta los 2 m de diámetro), con corteza de un blanco puro característico, que en la base del tronco se oscurece y agrieta con la edad. Los ejemplares jóvenes tienen la corteza pardusca. La copa es más o menos aovada, hojosa, pero de poca sombra, con las ramas casi erguidas.



Figura 3.1. *B. pendula*

-Extractos multifuncionales de corteza de abedul-

Las ramas del año y los retoños son glabros, con glándulas resinosas. Las yemas son agudas y las hojas miden unos 6 cm, de los cuales un tercio es el peciolo cilíndrico. Es una especie de fácil germinación y diseminación, que florece a finales del invierno. El fruto es una sámara bialada, con alas más anchas que la propia nuez (**Figura 3.2**).

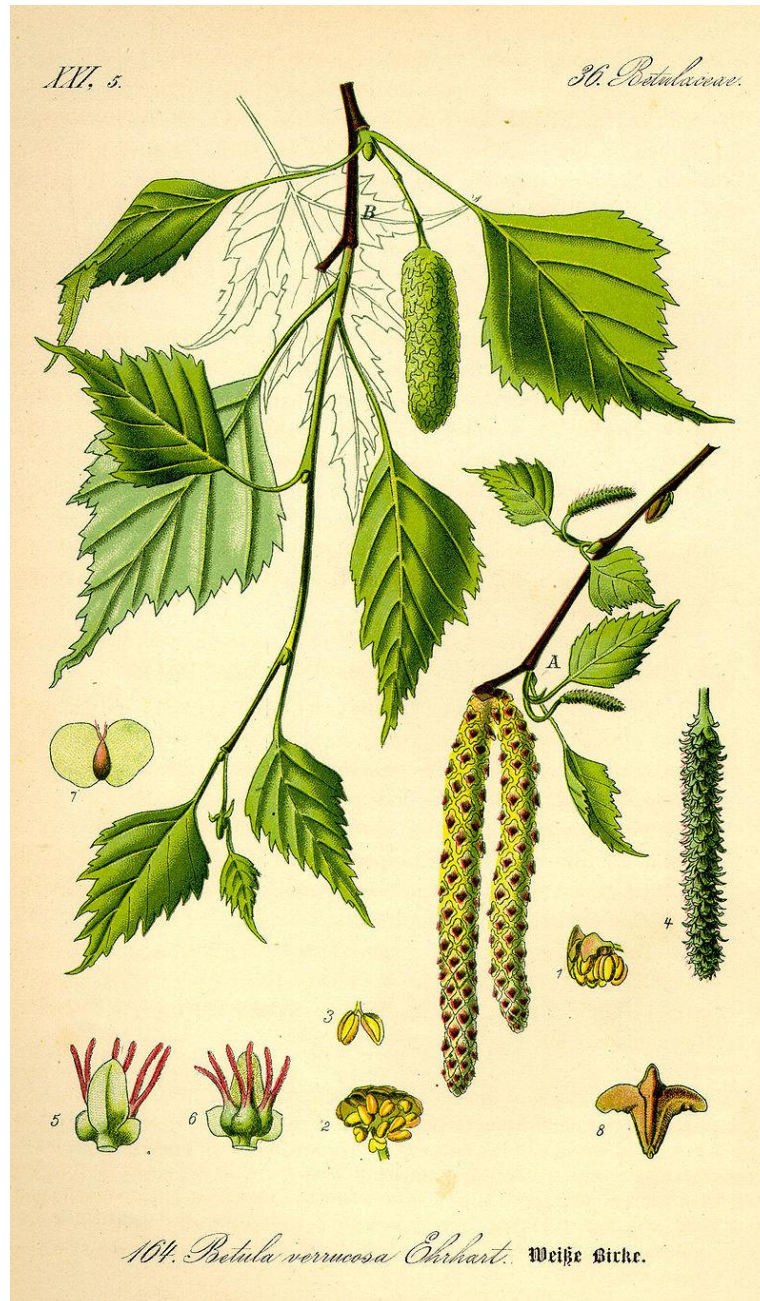


Figura 3.2. *B. pendula*: morfología.

La **madera de abedul** es muy apreciada por la industria maderera para diversas aplicaciones relacionadas con la carpintería y la ebanistería de calidad. Además, son conocidos también los **usos etnobotánicos** que se han atribuido a diversas elaboraciones

(e.g. infusiones, aceites esenciales, etc.) obtenidas a partir de abedul. Así, el aceite esencial posee propiedades analgésicas, antisépticas, antipiréticas y cicatrizantes, diversos preparados a partir de su corteza presentan beneficios como astringente, antidiarreico, tienen efecto hemostático local, etc., la savia es útil para el tratamiento de cistitis, gota, artritis, tendinitis, etc. (Sami y col. 2006; Aбыshev y col., 2007).

3.1.2. Corteza de abedul: revalorización y fuente de ingredientes bioactivos

La búsqueda de **nuevas fuentes naturales de compuestos bioactivos** en forma de extractos vegetales, ha despertado en los últimos años un gran interés. Adicionalmente a esta creciente demanda, cabe señalar que su explotación cobra mayor relevancia cuando la materia prima para la obtención de dichos extractos son **residuos** o subproductos disponibles en grandes cantidades, y cuyo aprovechamiento contribuiría a mejorar la sostenibilidad de la actividad industrial (Vidal y col., 2003; Ferreira y col., 2013b).

La industria de transformación de la madera genera un importante volumen de residuos (ramas, hojas, corteza, serrín, etc.) que recientemente están siendo evaluados como una nueva fuente de compuestos bioactivos en un contexto de economía circular en el que se maximice el aprovechamiento de recursos y se disminuyan en lo posible los residuos generados. Entre ellos, las cortezas de árboles y, en concreto, la de **abedul** es uno de los residuos generados en mayor proporción. Así, y a modo de ejemplo, 130.000 toneladas de corteza de abedul amarillo (*B. alleghaniensis*) se generaron en 2006 sólo en Quebec (Canadá) como resultado de su procesado (Diouf y col., 2009), lo que pone de manifiesto la importancia de dotar a estos residuos de un valor añadido. Si bien hasta el momento la búsqueda de **aplicaciones alternativas** se ha centrado fundamentalmente en procesos de producción de energía (Ferreira y col., 2013a), estas aplicaciones proporcionan rendimientos económicos insuficientes para compensar los costes asociados (Diouf y col., 2009). Por ello, y con el fin de estimular no sólo la actividad económica, sino de contribuir también a preservar el medioambiente, resulta imprescindible incorporar nuevas aplicaciones en el contexto de la biorefinería de abedul para un aprovechamiento completo de su biomasa.

Por otra parte, existen evidencias científicas en las que se ha puesto de manifiesto que los extractos de abedul presentan **diversas bioactividades** (Lavoie y Stevanovic,

2005; Sami y col., 2006; García-Pérez y col., 2008; Shikov y col., 2011; Król y col., 2014; Bache y col., 2015; Zhao y col., 2018; Ríos y Máñez, 2018), lo que justificaría su evaluación como una **nueva fuente de ingredientes bioactivos** de aplicación en ámbitos como el de los alimentos funcionales, los nutraceuticos, el de los productos cosméticos y farmacéuticos, etc. Estas propiedades se deben a su composición química que incluye, entre otros, compuestos de muy distinta naturaleza como triterpenoides y derivados, flavonoides, taninos, glicósidos, etc. (Krasutsky, 2006; Baser y Demirci, 2007; Jäger y col. 2008).

Los **triterpenoides pentacíclicos con estructura tipo lupano** son una de las clases más destacadas de compuestos bioactivos aislados a partir de diferentes tejidos (madera, corteza y follaje) de abedul (Diouf y col., 2009). Así, los extractos de corteza de abedul son ricos en triterpenoides como la betulina o el ácido betulínico, para los que se han descrito un amplio espectro de actividades biológicas y farmacológicas, entre las que cabe mencionar su actividad antiviral (principalmente antisida y antimalaria), anticáncer, anti-inflamatoria, antimicrobiana, etc. (Sami y col., 2006; Jäger y col., 2008; Shikov y col., 2011; Król y col., 2014; Bache y col., 2015; Ríos y Máñez, 2018), o como el lupeol y la lupenona, con actividad anti-inflamatoria, anti-artrítica, anti-protozoos, anticáncer, etc (Gallo y Sarachine, 2009; Wal y col., 2011) (**Figura 3.3**).

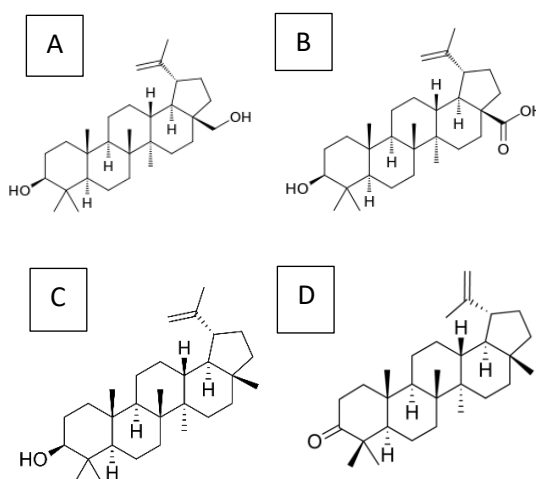


Figura 3.3. Triterpenoides de la familia del lupano. (A) Betulina, (B) ácido betulínico, (C) lupeol y (D) lupenona.

Por otra parte, existe una contrastada evidencia científica que atribuye un carácter antioxidante a los extractos ricos en **compuestos fenólicos** (flavonoides, catequinas, proantocianidinas, ácidos hidroxicinámicos, etc.) y derivados obtenidos a partir de diversas fuentes naturales, entre otros, la corteza de abedul (Mämmelä, 2001; Co y col., 2009).

Los antioxidantes son sustancias que, incluso en bajas concentraciones, retrasan o evitan la oxidación de sustratos fácilmente oxidables, siendo de aplicación en multitud de ámbitos, entre otros el alimentario o el cosmético. Si bien son de uso común en estos sectores los antioxidantes sintéticos como el BHA (butilhidroxianisol) o el BHT (butilhidroxitolueno), etc., existe hoy en día una creciente preocupación por los efectos sobre la salud de la acumulación en el cuerpo de este tipo de antioxidantes sintéticos. Esto ha dado lugar a que en los últimos años aumente la búsqueda de nuevas fuentes naturales de estos compuestos, evaluándose entre otras, su extracción a partir de corteza de abedul (Co y col., 2009; 2012; St-Pierre y col., 2013). Sin embargo, cabe decir que, hasta el momento, la mayoría de estudios previos que abordan la utilidad de esta matriz como fuente de compuestos antioxidantes, se han centrado en la determinación de esta bioactividad mediante distintos ensayos colorimétricos *in vitro* (contenido en polifenoles totales (ensayo TPC), ensayo del secuestro del radical DPPH· (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), etc.), siendo todavía escasos los estudios referidos a extractos de abedul que abordan su caracterización exhaustiva mediante técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masas o que tratan de correlacionar su composición y actividad antioxidante (Mämmelä, 2001).

Además de su carácter antioxidante, se han descrito también en menor medida otras bioactividades asociadas a diversos compuestos fenólicos, en el caso del abedul relativas principalmente a su contenido en flavonoles, como la actividad inhibidora de α -glucosidasas y de lipasa pancreática (Zhang y col., 2015).

Por otra parte, se han identificado también diversos fitosteroles comunes en plantas tales como el β -sitosterol y el estigmasterol (St-Pierre y col., 2013), que proporcionan a los extractos de abedul bioactividades tales como la capacidad para reducir la absorción del colesterol en el intestino (Matsuoka y col., 2008) o la mejora de los síntomas asociados a diversas afecciones urinarias (Wilt y col., 1999).

Además de las bioactividades previamente mencionadas, recientemente se está concediendo especial atención al estudio de las propiedades **antihiperlipidémicas** de los triterpenoides presentes en extractos de abedul (Slanc y col., 2009; Ríos y Máñez, 2018), dada su potencial aplicación para el control de la obesidad.

Según un informe de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) sobre la situación de la **obesidad** (o hiperlipidemia) en Europa (OCDE, 2010), ésta representa uno de los problemas de salud con mayor incidencia en los países desarrollados (e.g. en España, dos de cada tres hombres tienen sobrepeso y una de cada seis personas padece obesidad). Por otra parte, el exceso de peso lleva también asociado un gran número de patologías, incluyendo enfermedades cardiovasculares, hipertensión, arterioesclerosis, diabetes, etc. (Chanmee y col., 2013), que ocasionan un gran coste al sistema de sanidad, por lo que su prevención y tratamiento resulta crucial. Esta situación ha dado lugar a la creciente demanda actual por parte del consumidor de productos que, junto con una dieta saludable y ejercicio moderado, contribuyan al control del sobrepeso.

Si bien a lo largo del tiempo se ha aprobado el uso en diversos países de algunos fármacos para el tratamiento de la obesidad en adultos (Birari y Bhutani, 2007), sus serios efectos adversos han obligado a su retirada del mercado. En la actualidad, sólo un inhibidor de la enzima lipasa, el Orlistat (1-(3-hexil-4-oxo-oxetano-2-il)-tridecan-2-il 2-formilamino-4-metil-pentanoato), también conocido como tetrahidrolipstatina, que es un fármaco comercializado por Roche, se expende como tratamiento de larga duración para la obesidad (Seyedan y col., 2015).

Por otra parte, se ha descrito también el uso de diversos productos naturales, como los **complementos alimenticios basados en extractos de plantas**, como alternativa a estos fármacos de origen sintético, por contener fitoquímicos (saponinas, polifenoles, terpenoides, etc.) con actividad anti-lipasa (Birari y Bhutani, 2007; Slanc y col., 2009). Así, estudios previos han evidenciado que, los **extractos de abedul** permiten la reducción de la actividad de las enzimas involucradas en la digestión y absorción de lípidos (lipasas) (Slanc y col., 2009; Tucci y col., 2010).

La lipasa pancreática tiene como función hidrolizar los triglicéridos de la dieta a ácidos grasos absorbibles, por lo que sin esta enzima, dichos compuestos son excretados sin digerirse, reduciéndose así la ingesta de calorías (**Figura 3.4**).

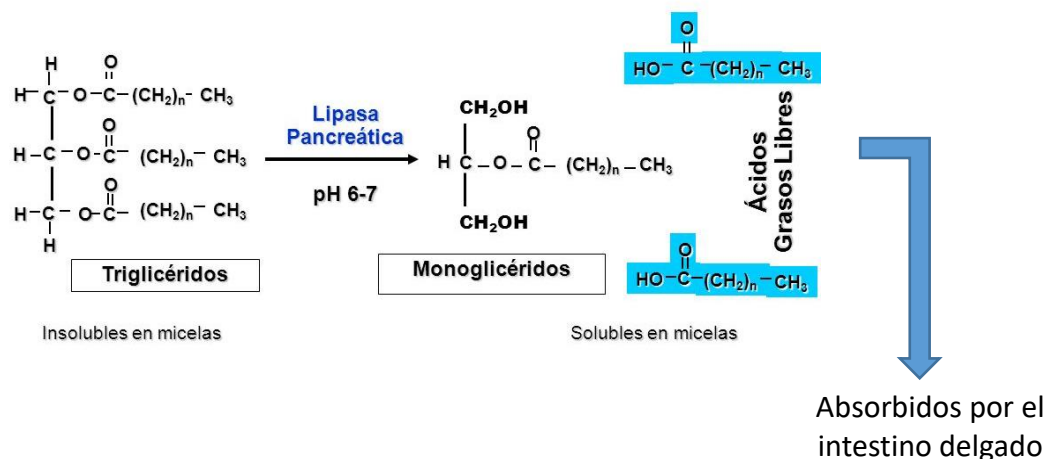


Figura 3.4. Hidrólisis de triglicéridos por acción de la lipasa pancreática.

Por último, cabe señalar como tendencia actual y con una previsible evolución futura, el desarrollo de **ingredientes naturales multifuncionales** a partir de residuos o subproductos y en este sentido, las numerosas bioactividades descritas para la corteza de abedul hacen de ella una fuente natural de interés.

3.1.3. Extracción de compuestos bioactivos de abedul

Si bien la amplia disponibilidad de corteza de abedul hace de ella un recurso con gran potencial para la obtención de extractos ricos en algunos de los compuestos bioactivos previamente comentados, como es el caso de la betulina, compuesto mayoritario (20-30% en peso seco) e interesante precursor de otros compuestos biológicamente más activos como el ácido betulínico, su explotación se ha visto limitada hasta el momento debido a la falta metodologías eficaces y de bajo coste que la hagan rentable a escala industrial.

Para la obtención de extractos bioactivos de corteza de abedul se han aplicado diferentes técnicas de extracción convencionales, como la extracción sólido-líquido (o maceración) o la extracción con Soxhlet (Lavoie y Stevanovic, 2005; Zhao y col., 2007; Freysdottir y col., 2011). Más recientemente, y como alternativa limpia a la extracción convencional, se han desarrollado metodologías en las que los disolventes orgánicos comúnmente empleados para la obtención de extractos de abedul, han sido reemplazados por líquidos iónicos (ILs) (Ferreira y col., 2013b). Sin embargo, la aplicación de estas

metodologías se centra hasta el momento en el aislamiento eficaz y selectivo de uno o unos pocos compuestos de interés como la betulina o el biopoliéster suberina, no existiendo antecedentes en los que se aborde la optimización de este tipo de metodologías para la obtención de extractos multicomponentes de abedul con propiedades bioactivas. Por otra parte, el reciclado y toxicidad de estos disolventes son todavía aspectos críticos que es necesario evaluar en profundidad previo a su implantación real en campos como el de los alimentos, nutraceúticos, etc.

Con el fin de mejorar la eficacia, disminuir el tiempo de extracción y consumo de disolventes y, en algunos casos incluso, aumentar la selectividad/bioactividad de los extractos obtenidos por los métodos convencionales de extracción, se han desarrollado también diversas metodologías basadas en técnicas avanzadas de extracción como UAE (Lavoie y Stevanovic, 2006, 2007; Qi-he y col., 2009; Diouf y col., 2009;), PLE (Co y col., 2009; Lin y col., 2018) y MAE (Ressmann y col., 2012; Zhou y col., 2012; Ferreira y col., 2013a,b, Koptelova y col., 2014).

La **UAE** haciendo uso de disolventes con distinta polaridad (etanol principalmente, pero también diclorometano) es, de entre estas técnicas, la más empleada para la obtención de extractos bioactivos de abedul. Así, existen diversos estudios en los que se compara tanto el rendimiento en triterpenoides y esteroides, como la actividad antioxidante de extractos obtenidos por UAE y maceración, a partir de diferentes tejidos (madera, corteza exterior e interior, follaje y ramas) de *B. alleghaniensis* Britton y *B. papyrifera* (Diouf y col., 2009; St-Pierre y col., 2013). En general, tanto la composición en compuestos lipofílicos determinada por GC-MS como en compuestos antioxidantes, determinada mediante diversos métodos espectrofotométricos, resultó similar por ambas técnicas. Sin embargo, la UAE resultó más rápida debido al efecto beneficioso sobre la extracción de la ruptura de paredes celulares y la mejora en la transferencia de masa ocasionada por la cavitación ultrasónica, siendo además una técnica con potencial para su escalado a nivel industrial.

Por otra parte, es necesario señalar que, tal y como describe Qi-he y col. (2009), las condiciones experimentales de extracción por UAE han de optimizarse teniendo en cuenta, no sólo los compuestos de interés, sino también el objetivo del estudio: incrementar la pureza o el rendimiento de extracción.

La **extracción con líquidos presurizados (PLE)** se ha aplicado también a la obtención de extractos de corteza de abedul ricos en terpenoides y antioxidantes. Así, Co y col. (2009), optimizaron haciendo uso de un diseño experimental diversas variables experimentales (disolvente, temperatura y tiempo) con influencia sobre la extracción por PLE de betulina y compuestos antioxidantes, siendo las condiciones óptimas de extracción las siguientes: etanol, 120°C, 15 minutos y 50 bar. Si bien los extractos tanto acuosos como etanólicos obtenidos a altas temperaturas (90-180°C) mostraron gran capacidad antioxidante, siendo mayor en el caso del agua, la eficacia en la extracción de betulina resultó superior al emplear etanol como disolvente, no pudiéndose extraer este compuesto en agua debido a su limitada solubilidad. Por otra parte, el pretratamiento de la muestra con agua, tanto a temperatura ambiente como a 180°C, resultó también favorable para la extracción de compuestos antioxidantes.

Recientemente, Liu y col. (2015) han implementado un método de extracción con agua subcrítica para la obtención de ácido betulínico de corteza de abedul. Los resultados obtenidos mediante esta técnica se encontraron entre los mejores, teniendo en cuenta el rendimiento de la extracción, así como la rapidez (28,03 mg/10 g de muestra en 27,37 min), frente a otras extracciones estudiadas como maceraciones con 70% etanol o etilacetato (23,76 mg/10 g muestra en 14 días y 30,70 mg/10 g de muestra en 24 h, respectivamente) y frente a UAE (0,21 mg/10 g de muestra en 2 h).

Otra de las técnicas que en los últimos años ha despertado un gran interés para la obtención de extractos con propiedades bioactivas ha sido la **extracción asistida por microondas (MAE)**, por sus ventajas en cuanto a eficacia y facilidad de operación (Azmir y col., 2013; Vinatoru y col., 2017; Belwal y col., 2018). Si bien esta técnica se ha aplicado a la extracción de compuestos bioactivos de muy distinta naturaleza (principalmente antioxidantes, carbohidratos, etc.) a partir de matrices diversas (plantas o residuos agroalimentarios, entre otros) (Ruiz-Aceituno y col., 2016; Moreira y col., 2017), su aplicación para la obtención de extractos de corteza de abedul es todavía muy limitada (Ressmann y col., 2012; Zhou y col., 2012; Ferreira y col., 2013a,b)

En general, cabe señalar que la mayoría de los estudios previamente descritos se han centrado en la optimización de los parámetros MAE con respecto a la extracción de compuestos mayoritarios en esta matriz como la betulina, evaluando las ventajas de las

metodologías MAE en comparación con otras técnicas de extracción, tanto convencionales como avanzadas (Koptelova y col., 2014).

Ferreira y col. (2013a), en un intento de mejorar la selectividad en la extracción de betulina, evitando así etapas posteriores de purificación, concluyeron que la extracción MAE (150 °C, 30 min) empleando limoneno como disolvente proporcionaba similares rendimientos de extracción (16% peso corteza), y una mayor selectividad (94% vs 68-75% betulina), que la extracción Soxhlet con cloroformo o etanol.

Como alternativa eficaz, rápida y limpia a la extracción convencional con disolventes orgánicos actualmente empleada a escala industrial para la extracción de betulina, Ressimann y col. (2012) describieron un procedimiento por MAE empleando ILs como extractantes, seguido de varias etapas de purificación, que mejoraba el rendimiento de extracción (hasta un 31%) y proporcionaba purezas de hasta el 98% de este compuesto farmacológicamente activo. Además, la posibilidad de recuperación tras la extracción del líquido iónico mediante destilación azeotrópica confiere a esta metodología un carácter verde, de gran interés para su potencial aplicación a escala industrial. Más recientemente, en un estudio llevado a cabo por Koptelova y col. (2014) se puso de manifiesto una notable reducción (10-15 veces menor) en el tiempo de extracción para obtener rendimientos de betulina similares a partir de corteza de abedul utilizando una fuente adicional de energía como las MW.

Por otra parte, en un estudio llevado a cabo por Zhou y col. (2012), se comparó la extracción de lignina de corteza de *B. alnoides* por MAE (88% ácido fórmico, 101 °C, 30 min, presión atmosférica) y por SLE (60 min), concluyéndose que los extractos MAE proporcionaban un mayor rendimiento (26 vs 19%) y delignificación (90 vs 66%) y una mayor actividad antioxidante (IC_{50} : 0,83 vs 1,15 mg mL⁻¹) que los extractos convencionales.

Sin embargo, y a pesar de los prometedores resultados previamente descritos sobre la aplicación de la MAE a la extracción de compuestos bioactivos de corteza abedul, son todavía necesarios estudios en los que se aborde la evaluación simultánea, haciendo uso de los correspondientes diseños experimentales, del efecto de las distintas variables MAE sobre la composición y bioactividad de extractos multifuncionales obtenidos a partir de dicha matriz.

3.1.4. Caracterización analítica y otros aspectos relevantes en el desarrollo de productos basados en extractos bioactivos de abedul

Cuando se pretende incorporar un extracto vegetal con propiedades bioactivas como ingrediente de un alimento funcional, o para su empleo como complemento alimenticio, entre otras aplicaciones, es necesaria una caracterización previa y exhaustiva de su composición, que considere no sólo los compuestos bioactivos de interés, sino también otros compuestos que pudieran coextraerse y poner en compromiso la seguridad de dichos extractos. Además, otros factores con gran relevancia para su potencial aplicación, como por ejemplo la estabilidad, deben también evaluarse, siendo necesario para este fin, disponer de las metodologías analíticas adecuadas.

Si bien la mayoría de los estudios sobre **caracterización** de extractos de corteza de abedul se basan en el empleo de técnicas cromatográficas como la GC-MS o HPLC-UV/Vis, en general, suelen centrarse en el análisis de sus compuestos mayoritarios o de un número muy limitado de sus componentes bioactivos (Başer y Demirci, 2007; Qi-he y col., 2009; Co y col., 2009; Diouf y col., 2009; St-Pierre y col., 2013), siendo todavía necesarios trabajos en los que se aborde una caracterización exhaustiva de su composición. Por otra parte, la potencial aplicación a escala industrial de este tipo de extractos requiere una estandarización de su composición, puesto que de ella depende su bioactividad, y en este sentido resulta imprescindible evaluar la variación en la composición de estos extractos asociada a factores como el hábitat y las condiciones ambientales de crecimiento, época de recogida, especie de abedul, etc. (Lavoie y Stevanovic, 2005), así como aumentar el conocimiento sobre la relación composición-bioactividad.

Respecto a la **estabilidad** de los componentes bioactivos de extractos vegetales, existen estudios previos principalmente referidos a polifenoles, carbohidratos y terpenoides, en los que se ha evaluado su estabilidad durante el proceso de obtención y/o posterior almacenamiento (Rodríguez-Sánchez y col., 2016). Si bien se ha descrito que temperaturas de extracción superiores a 100 °C pueden ocasionar la degradación de compuestos fenólicos, temperaturas elevadas pueden contribuir también a la extracción más eficaz de estos analitos o a reacciones inducidas por la temperatura que den lugar a nuevos compuestos con mayor actividad antioxidante (Dai y col., 2010). Este último efecto se ha observado en los extractos de *B. pendula* obtenidos mediante extracción con

agua presurizada, en los que temperaturas de 180 °C daban lugar a la isomerización de la catequina, con la consiguiente modificación en cuanto a bioactividad de los extractos así obtenidos (Co y col., 2012).

Por otra parte, se ha descrito también, que terpenoides tales como β -selineno y β -eudesmol son inestables tras largos períodos de almacenamiento (6 meses) (Deng y col., 2008), mientras que la atractilona es inestable incluso a temperatura ambiente durante almacenamientos inferiores a una hora (Hao y col., 2007). Cabe señalar que, hasta el momento, no existen antecedentes en los que se evalúe la estabilidad durante el almacenamiento de terpenoides bioactivos presentes en extractos de abedul.

En cuanto a la **seguridad** de los extractos de abedul, y a pesar de su importancia, son también escasas las referencias en las que se aborda esta temática. Así, existen estudios previos en los que se demuestra que componentes mayoritarios de los extractos de corteza de abedul como la betulina y el ácido betulínico resultan seguros en ratas en dosis de 500 mg Kg⁻¹ (Pisha y col., 1995; Jäger y col., 2008). Por otra parte, Huh y col. (2009; 2011) determinaron también mediante diversos ensayos *in vivo* con ratas, que los extractos hidroalcohólicos de corteza de *B. platyphylla* administrados por vía oral, no resultaban tóxicos en las concentraciones ensayadas (5 g/Kg). Sin embargo, es necesario resaltar que estas conclusiones no deben extrapolarse a los extractos obtenidos a partir de distintas especies de abedul o mediante distintas técnicas de extracción pues dichos factores, entre otros, pueden afectar a su composición y, por tanto, a su seguridad.

Con estos antecedentes, el **objetivo** de esta Sección ha sido la optimización de un método de extracción asistida por microondas (MAE) para la obtención de extractos multifuncionales (con actividad antilipasa y antioxidante) de corteza de *B. pendula*. Esta optimización se complementará con la caracterización analítica por GC-MS de la composición de los extractos obtenidos a partir de diversas muestras, así como con el estudio de su bioactividad, estabilidad y toxicidad, todo ello con el fin de avanzar en la revalorización de este residuo y su potencial explotación como ingrediente alimentario y/o nutraceútico.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Muestras y patrones

En este estudio se consideraron seis muestras diferentes de corteza de *Betula* sp. (**Figura 3.5**). La muestra BP1 (*B. pendula*) fue suministrada por Natac Biotech S.L., las muestras BP2 (*B. alba*), BP3 (*B. pendula*) y BP4 (*B. alba*) fueron amablemente cedidas por el Dr. R. Morales del Real Jardín Botánico del CSIC (Madrid, España) y las muestras BP5 (*B. alba*) y BP6 (mezcla de *B. pendula*, *B. alba* y *B. verrucosa*) se adquirieron comercialmente. Todas las muestras se secaron al aire a temperatura ambiente, se molieron con un molinillo (Moulinex, Barcelona, España), se tamizaron (< 500 μ m) y almacenaron en condiciones de sequedad y protegidas de la luz hasta su análisis.

Para el análisis por GC-MS de la composición de extractos MAE de abedul se emplearon patrones de betulina, ácido betulínico, catequina, fructosa, glucosa, sacarosa, *myo*-inositol, trehalosa, β -sitosterol, lupeol y lupenona, todos ellos de pureza superior al 98% y adquiridos comercialmente en Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

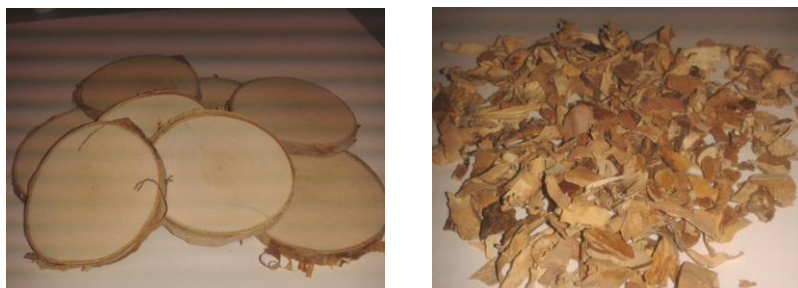


Figura 3.5. De izquierda a derecha, muestras BP5 y BP6 utilizadas en este estudio.

3.2.2. Optimización de las condiciones de extracción por MAE

Para la obtención de extractos MAE con propiedades bioactivas a partir de corteza de abedul se empleó un equipo MARS 6 (CEM, NC, USA) provisto de un carrusel rotatorio con capacidad para 12 vasos (modelo Green Chem, volumen de extracción mínimo/máximo: 10/100 mL) y dos magnetrones. La temperatura de extracción se controló mediante el empleo de una sonda de fibra óptica introducida en el interior del vaso control (error de la temperatura ± 1 °C). Todas las extracciones se llevaron a cabo a una potencia de 900 W.

En primer lugar, se evaluó el efecto sobre la extracción de compuestos bioactivos del **disolvente extractante**. Para ello, se introdujeron 0,5 g de la muestra BP1 y 10 mL del disolvente (etanol, metanol o agua) en los vasos de extracción y se sometieron a la acción de las microondas a una temperatura de 50 °C durante 17,5 minutos. Una vez seleccionado el disolvente, se optimizó también la **cantidad de muestra** (0,3, 0,5 y 1,0 g), empleando las condiciones de temperatura y tiempo de extracción previamente descritas. Todas las extracciones se llevaron a cabo por triplicado.

Posteriormente, y haciendo uso de un diseño experimental tipo Box-Behnken, se estudió el efecto de dos factores independientes (temperatura (T) y tiempo (t)) sobre la extracción de compuestos bioactivos de corteza de abedul. Se llevaron a cabo un total de 9 experimentos (diseño factorial de 3-niveles y tres puntos centrales por bloque) en orden aleatorio, tal y como se detalla en la **Tabla 3.1**. Los rangos experimentales para los factores evaluados fueron $T = 50-150$ °C y $t = 5-30$ min.

El modelo cuadrático propuesto fue:

$$R = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 t + \beta_{1,1} T^2 + \beta_{2,2} t^2 + \beta_{1,2} Tt + \varepsilon \quad (\text{Ec. 3.1})$$

donde β_0 es la ordenada en el origen, β_i son los coeficientes de primer orden, $\beta_{i,i}$ son los coeficientes cuadráticos para los i factores, $\beta_{i,j}$ los coeficientes para la interacción de los factores i y j y ε es el error. Para la optimización del método MAE, se consideraron individualmente tres variables respuesta (R): $R1$ hace referencia al rendimiento de la extracción (datos en mg g^{-1} de muestra seca), evaluado como la cantidad total extraída de una serie de compuestos seleccionados, bien por su actividad, bien por ser componentes mayoritarios de los extractos, incluyendo betulina, ácido betulínico, betulósido, un isómero del betulósido, tres isómeros del 1-pentosil-betulósido, catequina, β -sitosterol, lupeol y pentosil-catequina; $R2$ (datos en mg g^{-1} de extracto seco) es una medida de la riqueza del extracto en los compuestos seleccionados de los extractos MAE obtenidos en distintas condiciones experimentales, al considerar también la coextracción de otros compuestos; y $R3$ es una medida de la bioactividad de dichos extractos, concretamente de la actividad antiobesidad, cuantificada como porcentaje de inhibición de la enzima lipasa pancreática (ver sección 3.2.4). Los parámetros del modelo que maximizaron individualmente $R1$, $R2$ y $R3$ se estimaron mediante regresión lineal múltiple (MLR) empleando el paquete estadístico StatGraphics Centurion XV (Statistical Graphics

Corporation, Rockville, MD, USA). Así mismo, se consideró también una función de deseabilidad (R_D), que puede tomar valores comprendidos entre 0 (indeseable) y 1 (deseable), como respuesta que simultáneamente maximizaba R_2 y R_3 . Por último, y en las condiciones de extracción elegidas como óptimas, se evaluó también el número de ciclos de extracción (C1-C3).

Transcurrido el correspondiente y previamente establecido tiempo de extracción, todos los extractos MAE fueron inmediatamente sumergidos en un baño de agua-hielo para detener el proceso de extracción. A continuación, dichos extractos se filtraron usando papel Whatman No. 1 y se almacenaron en congelación (-18 °C) hasta su análisis.

3.2.3. Análisis cromatográfico

Derivatización

Previo a la caracterización por GC-MS de los extractos de abedul, y con el fin de dotar a los compuestos de interés y otros compuestos coextraídos de la requerida volatilidad y estabilidad térmica para su análisis por esta técnica, se llevó a cabo una derivatización en dos pasos (oximación + sililación) de acuerdo al procedimiento descrito por Sanz y col. (2002), con ligeras modificaciones. Para ello, 2,5 mL de extracto y 0,21 mL de una disolución en etanol al 70% de fenil- β -D-glucósido en concentración 1 mg mL⁻¹, empleado como patrón interno, se secaron en rotavapor a una temperatura de 40 °C hasta sequedad. A continuación, las oximas se obtuvieron por adición de 350 μ L de una disolución al 2,5% de cloruro de hidroxilamina en piridina, mediante calentamiento de la mezcla a 75 °C durante 30 min. Estos derivados se sililaron posteriormente mediante adición de hexametildisilazano (350 μ L) y ácido trifluoroacético (35 μ L) y termostatación a 45 °C durante 30 min. Tras la reacción, las muestras fueron centrifugadas a 4400 g durante 10 min y el sobrenadante obtenido se analizó por GC-MS. Todos los reactivos empleados fueron adquiridos comercialmente en Sigma-Aldrich.

Análisis por GC-MS

Los análisis por GC-MS de las muestras previamente derivatizadas se llevaron a cabo empleando un cromatógrafo de gases 7890A acoplado a un detector de masas cuadrupolar modelo 5975C (ambos de Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). La

columna utilizada fue una columna capilar Zebron ZB-1MS (Phenomenex, CA, USA), con fase estacionaria polidimetilsiloxano, de las siguientes dimensiones: 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 μm de espesor de fase. Se empleó como gas portador helio de alta pureza ($> 99.999\%$) a un flujo de $\sim 1 \text{ mL min}^{-1}$. La programación de temperatura del horno empleada incluyó las siguientes etapas: $200 \text{ }^\circ\text{C}$ (0 min) - $15 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ - $270 \text{ }^\circ\text{C}$ (0 min) - $1 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ - $290 \text{ }^\circ\text{C}$ - $15 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ - $310 \text{ }^\circ\text{C}$ (30 min).

Dado que los extractos de corteza de abedul presentaban compuestos en muy distinta concentración, cada uno de los extractos MAE se inyectó tanto en modo división de flujo (relación de split 1:20), como sin división de flujo (modo splitless, 0,5 min tiempo de splitless). Todas las inyecciones se llevaron a cabo a una temperatura de $280 \text{ }^\circ\text{C}$. La línea de transferencia y la fuente de ionización se termostataron a 280 y $230 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. La ionización de los analitos previamente separados se llevó a cabo en modo impacto electrónico a un potencial de 70 eV , adquiriéndose relaciones masa/carga (m/z) en el rango $40\text{--}700$. Para la adquisición de datos se empleó el software HP ChemStation (Agilent Technologies).

El análisis cualitativo se basó en la comparación de los espectros de masas e índices de retención lineales (*IT*) experimentales con datos previamente descritos en la bibliografía (Vainiotalo y col., 1991; Beveridge y col., 2002; Hiltunen y col., 2006), y mediante interpretación de los patrones de fragmentación de los espectros de masas de los compuestos detectados. En los casos en los que fue posible, la identificación se confirmó mediante el análisis en idénticas condiciones experimentales de los correspondientes patrones comerciales listados en la sección 3.2.1.

Los datos cuantitativos se obtuvieron mediante el método del patrón interno. Los resultados se expresaron en miligramos por gramo de muestra seca (rendimiento de la extracción) y en miligramos por gramo de extracto seco (selectividad de la extracción).

3.2.4. Actividad inhibidora de la enzima lipasa pancreática

La evaluación de la actividad antilipasa de los extractos MAE de corteza de abedul previamente obtenidos se determinó tal y como se describe en Panteghini y col. (2001), mediante un ensayo colorimétrico basado en la hidrólisis, catalizada por la lipasa

pancreática, del sustrato cromático 1,2-*O*-dilauril-rac-glicero-3-ácido glutárico-(6-metilresorufina)-éster para dar 1,2-*O*-dilauril-rac-glicerol y ácido glutárico-(6-metilresorufina)-éster, producto éste último inestable en solución alcalina y que descompone a ácido glutárico y metilresorufina (**Figura 3.6**). La metilresorufina de color fucsia puede cuantificarse espectrofotométricamente a una longitud de onda de 570 nm, siendo su determinación una medida indirecta de la actividad de esta enzima y, por tanto, de la actividad inhibidora de los extractos en estudio.

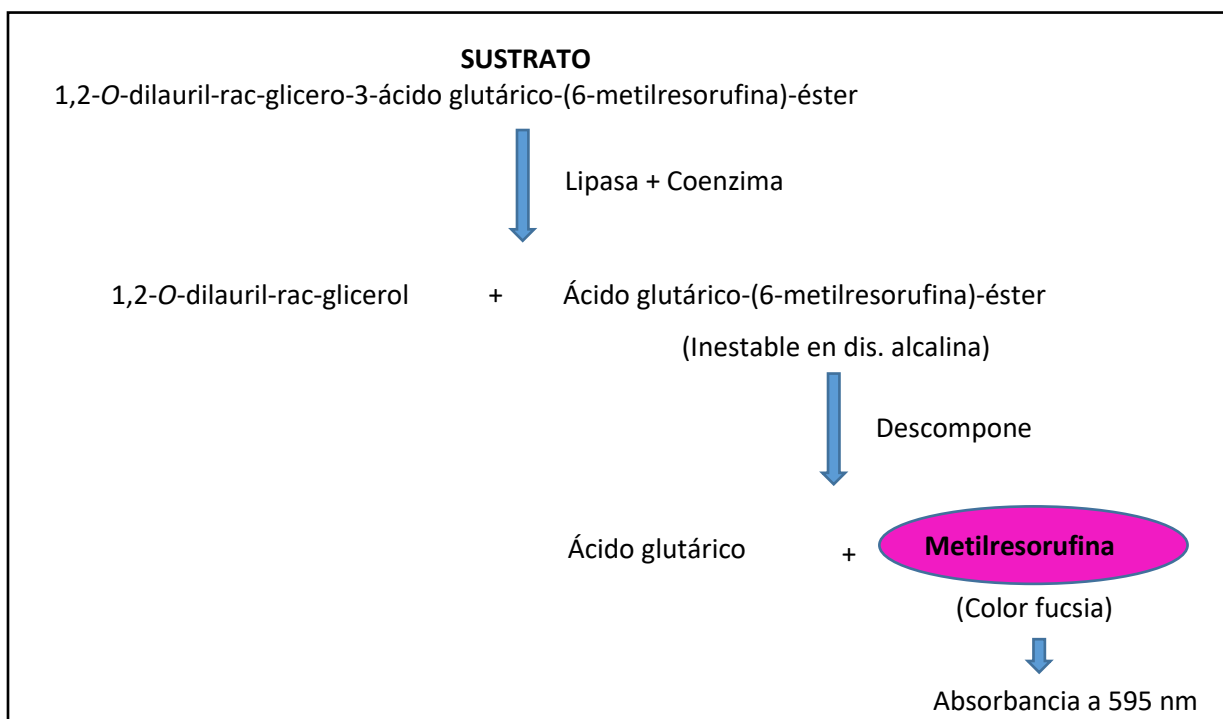


Figura 3.6. Ensayo para la determinación de actividad antilipasa de extractos de corteza de abedul.

Para este ensayo *in vitro* se empleó una lipasa pancreática porcina (Tipo II) de 22,7 unidades mg^{-1} de proteína (Sigma Chemical Co.) y el correspondiente kit de reactivos comercializado por Roche/Hitachi (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, USA).

Tras una serie de ensayos preliminares en los que se optimizó la concentración de enzima disuelta en buffer, 0,1 M Tris/HCl, 0,1 M NaCl (pH 8) (Sigma Chemical Co.), se seleccionó como óptimo el valor de 0,066 mg mL^{-1} para la evaluación de la actividad antilipasa de extractos de abedul. Esta disolución de la enzima (20 μL) se mezcló en una placa de 96 pocillos con 80 μL de colipasa y 10 μL del extracto MAE de corteza de abedul

a diferentes diluciones (extracto puro, dilución (v:v) 1:2, 1:5, 1:10, 1:20 y 1:100). Finalmente, se añadieron 50 μ L del sustrato de la lipasa (1,2-O-dilauril-rac-glicero-3-ácido glutárico-(6-metilresorufina)-éster). Los controles negativos consistieron en la misma mezcla, reemplazando las disoluciones potencialmente inhibitoras de esta enzima con el disolvente de extracción. Además, y puesto que los extractos de abedul a medir eran ligeramente coloreados, se llevaron a cabo los correspondientes controles de color sustituyendo la disolución enzimática por el buffer. Como control positivo se empleó el fármaco comercial Orlistat (Roche).

Tras una agitación suave de la placa, la reacción se incubó a 37 °C durante 20 min. La inhibición de la lipasa se determinó mediante medida de la absorbancia (A) a 595 nm, haciendo uso de un lector de placas ELx800 (BioTek, Swindon, UK) provisto del requerido filtro. El porcentaje de inhibición de lipasa (% I_{lipasa}) se determinó de acuerdo a la ecuación 3.2:

$$\% I_{lipasa} = [(\Delta A_{control} - \Delta A_{muestra}) / \Delta A_{control}] \times 100 \quad (\text{Ec. 3.2})$$

donde: $\Delta A_{control} = A_{control} - A_{blanco}$ y $\Delta A_{muestra} = A_{test} - A_{blanco}$; $A_{control}$ es la absorbancia del control (que contiene todos los reactivos excepto la muestra) y $A_{muestra}$ es la absorbancia del extracto de abedul a evaluar. Todos los extractos se evaluaron por triplicado.

A modo de ejemplo, en la **Figura 3.7** podemos observar las distintas coloraciones obtenidas para algunos de los ensayos llevados a cabo. Así, los pocillos correspondientes al control negativo de este ensayo, que incluyen enzima y sustrato, pero no inhibidor (fila “B” de la placa), muestran una coloración fucsia intensa. Sin embargo, los pocillos a los que se ha adicionado además extracto de abedul (filas C y E) muestran una coloración más débil, siendo esta disminución de color proporcional al grado de inhibición de la enzima. Así mismo, y como puede observarse en la fila “E”, para un mismo extracto, el porcentaje de inhibición es inversamente proporcional a la dilución del extracto y, por tanto, los extractos más diluidos presentan una coloración más intensa. Las filas D y F corresponden a los blancos de color de los extractos (coloración cuya absorbancia será restada en el ensayo de inhibición correspondiente).

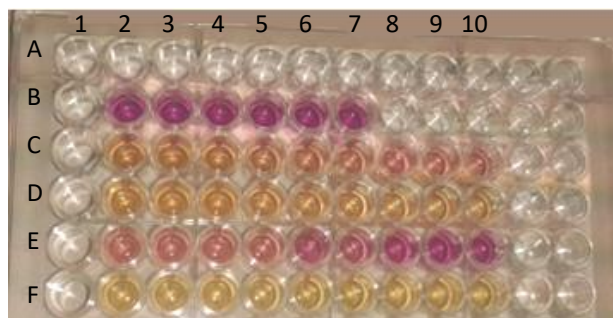


Figura 3.7. Ensayo *in vitro* de la actividad inhibidora de lipasa pancreática. Absorbancia a 595 nm del control negativo (pocillos B2-B7) y de distintas diluciones (crecientes) de extractos de abedul (pocillos C2-C10 y E2-E10) Las filas D y F corresponden a los blancos de color de los ensayos realizados en los pocillos inmediatamente superiores (filas C y E respectivamente). Ensayos realizados por triplicado ($n=3$).

3.2.5. Contenido total de polifenoles (TPC)

El contenido total de polifenoles de los extractos MAE de *B. pendula* se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu. Dicho método se basa en el uso del reactivo del mismo nombre, que contiene una mezcla de wolframato y molibdato sódico de un característico color amarillo, que reacciona con los compuestos fenólicos formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico. La transferencia de electrones a pH básico reduce dichos complejos a óxidos de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}) de color azul, siendo proporcional esta coloración (determinada espectrofotométricamente a 765 nm) al contenido en polifenoles de la muestra (Singleton y col., 1999).

La adaptación del método de Folin-Ciocalteu a las muestras en estudio se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento descrito por Soria y col. (2010a), con ligeras modificaciones. A un vial de 1,5 mL se le añade una alícuota (100 μ L) del extrato de abedul diluido 1:150 (v:v), 100 μ L de metanol ($\geq 99,8\%$, Sigma-Aldrich) y 100 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu (2 N, Sigma-Aldrich), agitándose la mezcla obtenida en vortex para su homogeneización. Transcurridos 5 min, se le adicionan 700 μ L de una disolución de Na_2CO_3 (Panreac, Barcelona, Spain) 75 g L^{-1} y se vuelve a agitar brevemente en vortex. Las muestras así obtenidas se incuban en oscuridad y a temperatura ambiente durante 20 min y, a continuación, se centrifugan a 13000 rpm durante 3 min. Finalmente, se mide ($n = 3$) la absorbancia del sobrenadante a 750 nm.

La determinación cuantitativa del TPC se llevó a cabo a partir de un calibrado de ácido gálico (Sigma-Aldrich) empleado como referencia, incluyendo concentraciones en el rango 10-100 mg L⁻¹. Los resultados obtenidos para los extractos de corteza de abedul se expresaron como miligramos de equivalentes de ácido gálico (GAE) mL⁻¹.

3.2.6. Actividad antioxidante

Otro de los métodos empleados para determinar la capacidad antioxidante de los extractos MAE de *Betula pendula* se basó en la medida propuesta por Blois (1958) de la capacidad del radical libre DPPH· (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) para aceptar un átomo de hidrógeno proveniente de una molécula donadora de protones, cuyo fundamento se detalla a continuación.

La molécula de DPPH· posee un electrón desapareado y deslocalizado en resonancia, por lo que es un radical libre estable que no se dimeriza, como suele ser el caso para la mayoría de radicales libres. Esta deslocalización electrónica intensifica además el color violeta típico de este radical, cuya disolución metanólica absorbe en torno a 520 nm.

Cuando la disolución de DPPH· entra en contacto con un sustrato antioxidante capaz de donarle un átomo de hidrógeno, se produce la forma reducida del DPPH (**Figura 3.8**), con la consiguiente pérdida de color que puede monitorizarse espectrofotométricamente para determinar la capacidad antioxidante del sustrato.

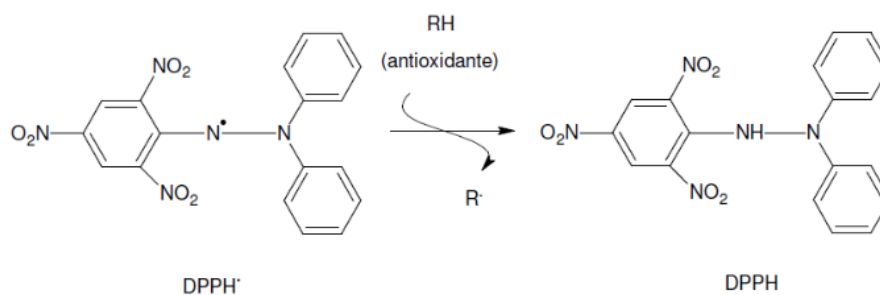


Figura 3.8. Reacción entre el DPPH· y un antioxidante (Moon y Shibamoto, 2009).

La aplicación del ensayo del DPPH a los extractos de abedul se llevó a cabo de acuerdo a Moldovan y col. (2014), con ligeras modificaciones. A una alícuota de 50 μL de extracto de corteza de abedul obtenido en las condiciones MAE previamente optimizadas se le añadieron 45 μL de una disolución 0,001 M de DPPH \cdot (Sigma-Aldrich) en metanol (Scharlau, España). Después de 30 min de incubación en oscuridad y a 40 $^{\circ}\text{C}$, se mide ($n = 3$) la disminución de la absorbancia a 540 nm utilizando el lector de placas previamente descrito en la sección 3.2.4.

El porcentaje de inhibición del radical libre (% I_{DPPH}) se estimó utilizando la ecuación 3.3. Como control positivo se empleó el agente antioxidante Trolox (Sigma-Aldrich).

$$\%I_{\text{DPPH}} = \frac{(Abs_{max} - A_{blanco}) - (Abs_i - blanco_i)}{(Abs_{max} - A_{blanco})} \quad (\text{Ec. 3.3})$$

donde Abs_{max} es la absorbancia de los pocillos a los que se les han adicionado todos los reactivos excepto los potenciales inhibidores (en su lugar, se les adicionó el disolvente del mismo); A_{blanco} es la absorbancia correspondiente a los pocillos a los que se les han adicionado todos los reactivos a excepción del DPPH \cdot ; Abs_i es la absorbancia leída para los pocillos a los que han adicionado tanto el radical libre DPPH \cdot , como el potencial inhibidor o extracto a testar y $blanco_i$ es la absorbancia leída para los pocillos a los que se han adicionado todos los reactivos a excepción del DPPH \cdot , encontrándose el potencial inhibidor en las mismas condiciones de concentración en las que se testó su bioactividad.

3.2.7. Evaluación de la viabilidad celular

Para este ensayo, se hicieron crecer células humanas Caco-2 en un medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) F-12 (Lonza, Suiza), complementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) (Lonza, Suiza) y una disolución 50 mg L^{-1} de varios antibióticos (gentamicina, penicilina y streptomycin, Sigma-Aldrich). Las células así crecidas se mantuvieron a 37 $^{\circ}\text{C}$ en una atmósfera húmeda con un 5% CO_2 , hasta que previo al ensayo y con una antelación de 24 h, se cambiaron a un medio sin suero con el fin de evitar que los factores de crecimiento contenidos en el FBS interfirieran en los resultados.

Para estudiar el efecto sobre las células Caco-2 de los extractos MAE de corteza de abedul en estudio, se adicionaron a los pocillos de una placa (Falcon, Cajal) diferentes

concentraciones de extracto (0,1-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de compuestos bioactivos seleccionados), diluídas en medio de cultivo sin suero y se incubaron durante 24 h. Transcurrido el periodo de incubación, los cultivos celulares se procesaron de acuerdo al ensayo de tinción de Cristal Violeta (Granado-Serrano y col., 2007). Las células Caco-2 crecidas durante 20 h se sembraron (2×10^5 células / pocillo) en los pocillos previamente tratados con los extractos de abedul obtenidos por MAE, y finalmente se incubaron con una disolución al 0,2% de Violeta de Cristal (Sigma) en etanol durante 20 min.

Las placas así preparadas se lavaron con agua Milli-Q (Millipore, Burlington, MA, USA) y se llevaron a sequedad para añadir a continuación una disolución al 1% de dodecil sulfato de sodio (Panreac, Barcelona, España). La absorbancia de cada pocillo se midió ($n = 3$) a 570 nm utilizando un lector de placas (Bio-Tek, Winooski, VT, USA). La viabilidad celular se determinó como el porcentaje relativo de Cristal Violeta que teñía a las células control.

3.2.8. Estabilidad durante el almacenamiento

Con el fin de evaluar la estabilidad de los extractos MAE de abedul, se llevó a cabo un almacenamiento en condiciones aceleradas del extracto correspondiente a la muestra BP1. Para ello, alícuotas (2 mL) de dicho extracto, previamente secadas, se almacenaron por duplicado en viales de 15 mL a temperatura controlada (50 ± 5 °C) durante 1 mes para simular un almacenamiento en condiciones desfavorables. Se tomaron muestras a los 0, 3, 7, 14 y 30 días de almacenamiento. Además, y con el fin de simular las condiciones reales de almacenamiento de estos extractos que podrían emplearse en su potencial aplicación como ingredientes bioactivos, nutraceúticos, etc., se llevó a cabo un estudio de estabilidad a temperatura ambiente durante un período de almacenamiento de un año. En este caso, las muestras se almacenaron (por duplicado) durante 0 días, 15 días, 1 mes, 6 meses y 1 año.

3.2.9. Tratamiento con levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) de extractos MAE

Los tratamientos con *S. cerevisiae* se llevaron a cabo tomando 2 mL de los extractos MAE y añadiendo 0,5 mL de una disolución de levadura en agua (71 mg mL^{-1}), previamente activada mediante agitación a 37 °C durante 30 min. Se

preparó también una muestra control empleando 0,5 mL de agua. Tanto las muestras tratadas como la muestra control se incubaron durante 2 y 5 h. Transcurridos los tiempos de incubación, las muestras se centrifugaron a 8100 rpm y a 4 °C durante 10 min, se derivatizaron y se analizaron mediante GC-MS (Sección 3.2.3). Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

3.2.10. Análisis estadístico

Los datos se evaluaron estadísticamente mediante un análisis de la varianza (ANOVA, test de Fischer de diferencias significativas (LSD)) utilizando el paquete informático Statistica 7.0 para Windows (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Las diferencias fueron consideradas como significativas al 95% ($P < 0,05$).

3.3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.3.1. Optimización de la extracción por MAE de compuestos bioactivos de corteza de abedul

Los parámetros que se han descrito como más relevantes en cuanto a rendimiento y selectividad de la extracción asistida por microondas son la naturaleza del disolvente, la temperatura y, en menor medida, el tiempo de extracción (Soria y col., 2015). Sin embargo, y previo a la evaluación experimental de dichos parámetros con respecto a la obtención de extractos bioactivos de abedul, resulta imprescindible llevar a cabo una caracterización detallada de su composición en base a la cual seleccionar los compuestos cuya extracción se pretende maximizar.

Considerando los resultados de estudios preliminares llevados a cabo en el laboratorio sobre la extracción sólido-líquido de compuestos bioactivos a partir de corteza de abedul (Soria y col., 2010b), así como los antecedentes descritos en la literatura (Diouf y col., 2009; St-Pierre y col., 2013), se seleccionaron como **disolventes extractantes** a ensayar agua, metanol y etanol. Así, y a modo de ejemplo, la **Figura 3.9** muestra el perfil cromatográfico obtenido por GC-MS para un extracto de abedul (BP1) obtenido por MAE a 50 °C durante 17,5 minutos empleando metanol como disolvente. Como puede observarse, en el extracto analizado se detectaron una gran variedad de compuestos de distinta naturaleza y con potencial bioactividad (triterpenoides, compuestos fenólicos, etc.), junto a otros compuestos (carbohidratos de bajo peso molecular, LMWC), cuya coextracción debe también considerarse a la hora de seleccionar las condiciones MAE óptimas, pues su presencia puede interferir en la pretendida aplicación de estos extractos para el control de la obesidad.

Respecto a la composición cuantitativa, los compuestos más abundantes en el extracto MAE metanólico de abedul resultaron ser el betulósido, tres isómeros diferentes de pentosil-betulósido, la betulina, la catequina y una pentosil-catequina. Otros compuestos presentes en este extracto, aunque en menores proporciones, fueron β -sitosterol, lupeol y ácido betulínico. En cuanto a su contenido en LMWC, se detectaron diversos monosacáridos como fructosa y glucosa, disacáridos como sacarosa, trehalosa y dos isómeros de pentosil-pentosa, caracterizados por su espectro de masas, y polialcoholes como el *myo*-inositol. Las estructuras de los compuestos más

representativos de la **Figura 3.9**, así como los espectros de masas de los compuestos más representativos, se muestran en los **Anexos II y III**, respectivamente.

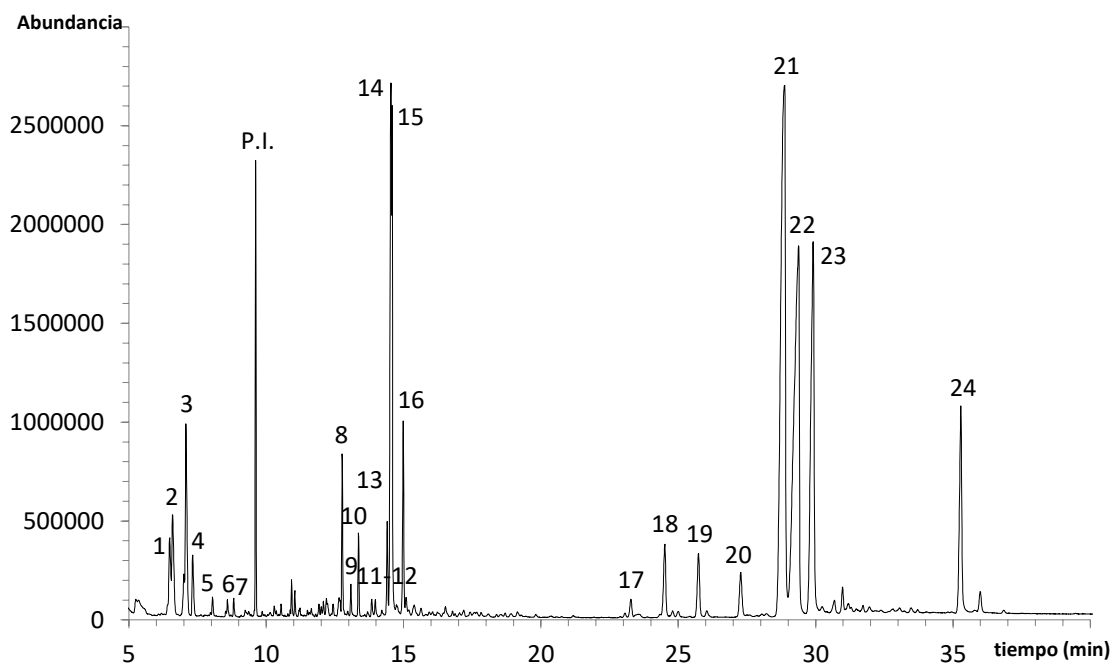


Figura 3.9. Perfil de GC-MS del extracto de corteza de abedul BP1 obtenido mediante MAE (50 °C, 17,5 min, 0,5 g muestra seca, 10 mL de metanol): 1) y 2) fructosa (isómeros *E*- y *Z*-), 3) y 4) glucosa (isómeros *E*- y *Z*-), 5) *myo*-inositol, 6) ácido octadecanoico, 7) ácido decanoico, 8) sacarosa, 9) glicósido, 10) pentosil-pentosa (isómero I), 11) pentosil-pentosa (isómero II), 12) trehalosa, 13) isómero del betulósido, 14) betulósido, 15) ácido betulínico, 16) catequina, 17) β -sitosterol, 18) lupeol, 19) 1-pentosil derivado de glicósido, 20) 1-pentosil betulósido (isómero I), 21) 1-pentosil betulósido (isómero II), 22) betulina, 23) 1-pentosil betulósido (isómero III), 24) pentosil-catequina. P.I.: patrón interno.

En cuanto a la comparación de los resultados obtenidos haciendo uso de distintos disolventes, cabe señalar que, si bien la composición cualitativa resultó similar en los tres casos, se observaron diferencias cuantitativas asociadas al disolvente elegido para la obtención de extractos de abedul (**Figura 3.10**). Así, el metanol resultó ser el disolvente más eficaz para la extracción de betulina y betulósidos, no mostrando diferencias significativas con respecto al etanol en cuanto a la extracción de catequina y 1-pentosil-betulósidos y siendo el único disolvente que permitió la extracción de salidrósido. Por su parte, el agua extrajo las concentraciones más bajas de betulina debido a su limitada solubilidad en este disolvente, y la mayor coextracción de monosácaridos y 1-pentosil-betulósidos. En cuanto a la extracción de otros compuestos minoritarios como el lupeol y

β -sitosterol, cabe mencionar que dichos compuestos no se detectaron tampoco en los extractos acuosos, y que sus concentraciones no difirieron significativamente al emplear metanol o etanol como extractante. Teniendo en cuenta estos resultados, se seleccionó el metanol como el disolvente más apropiado para la extracción de compuestos de abedul con potencial bioactividad, minimizándose también la presencia en dichos extractos de compuestos interferentes. La elección de este disolvente se justifica también por datos descritos en la bibliografía en los que metanol y etanol son los disolventes generalmente elegidos para la extracción, entre otros, de compuestos bioactivos como los polifenoles a partir de residuos procedentes de la industria maderera (Tolstikov y col., 2005; Co y col., 2009; St-Pierre y col., 2013; Moreira y col., 2017).

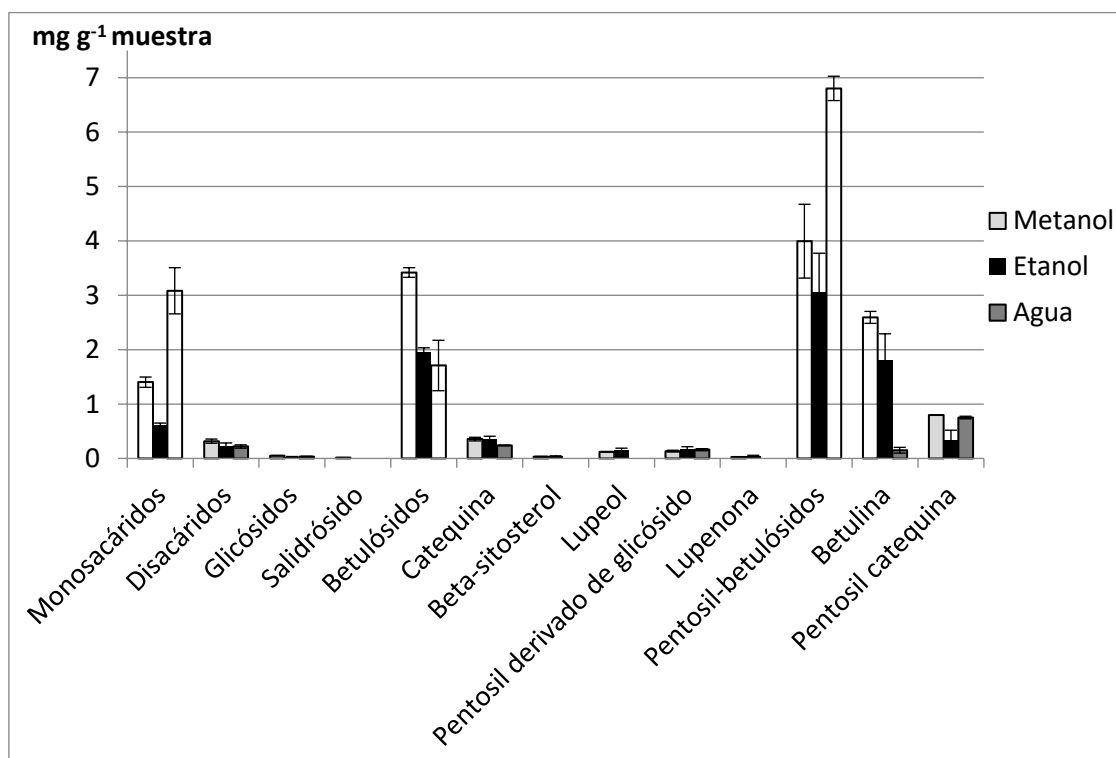


Figura 3.10. Optimización del disolvente extractante. Concentración (mg g^{-1} muestra) de los compuestos extraídos por MAE a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 17,5 min empleando 10 mL de diferentes disolventes (metanol, etanol y agua) y una cantidad fija de muestra BP1 (0,5 g).

Una vez seleccionado el disolvente, se procedió a evaluar la **relación cantidad (g) de muestra / volumen (mL) de disolvente**. Así, para el pretendido desarrollo de un método MAE miniaturizado, y puesto que los vasos de extracción utilizados requieren el empleo de un volumen mínimo de 10 mL para asegurar un calentamiento homogéneo, se fijó este volumen y se llevaron a cabo extracciones a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 17,5 minutos,

empleando 0,3, 0,5 y 1 g de muestra BP1 (**Figura 3.11**). En general, para la mayoría de compuestos, los mejores rendimientos de extracción se obtuvieron al utilizar 0,5 g de muestra, excepto en el caso de los 1-pentosil-betulosidos que se extrajeron más eficazmente partiendo de 0,3 g de corteza de abedul. Así, y a pesar de que el contenido en monosacáridos era también ligeramente superior para cantidades intermedias de muestra, se seleccionó la relación 0,5 g de muestra / 10 mL de disolvente como la óptima teniendo en cuenta que la purificación de estos extractos en cuanto a LMWC podría abordarse en etapas posteriores de la optimización.

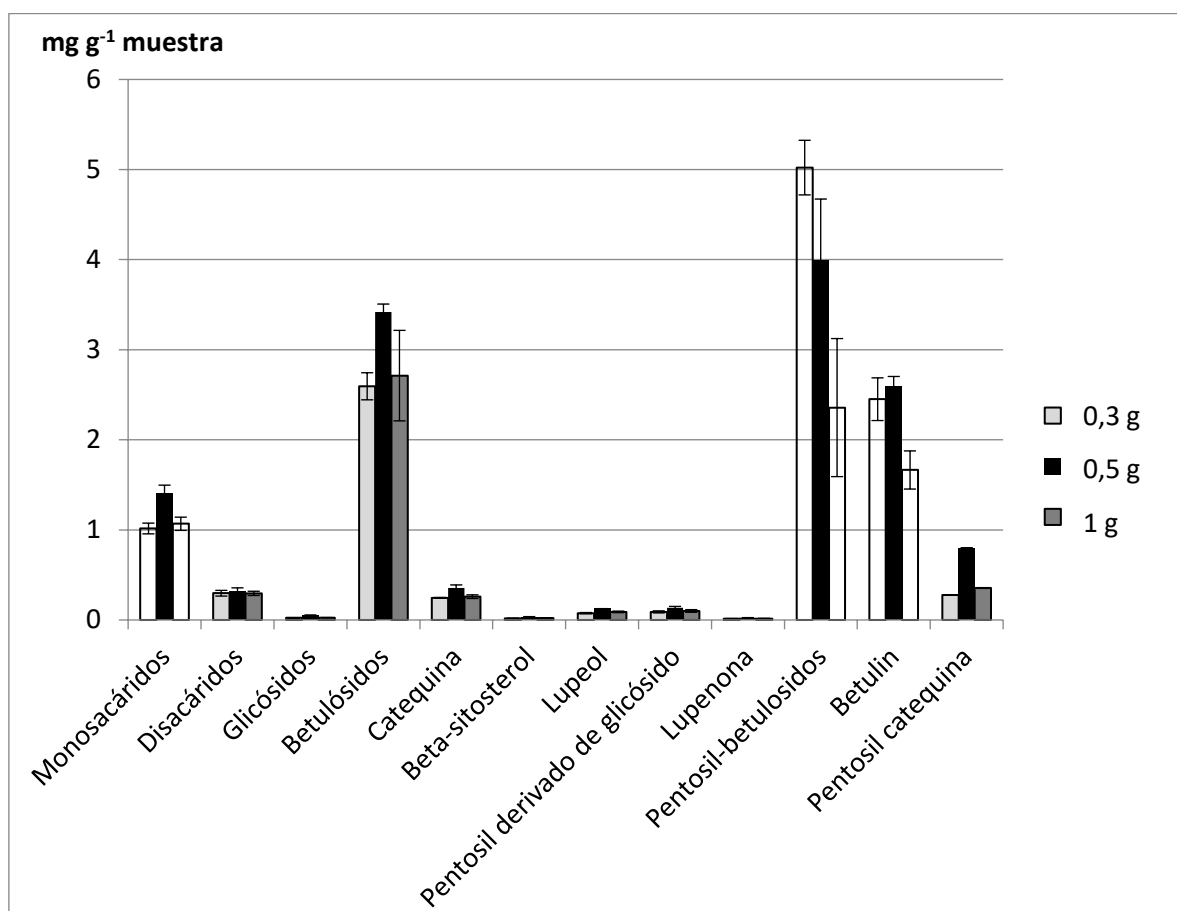


Figura 3.11. Optimización de la relación cantidad de muestra/volumen de disolvente. Concentración (mg g^{-1} muestra) de los compuestos extraídos por MAE a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 17,5 minutos empleando 10 mL de metanol.

Una vez seleccionados tanto el disolvente como la relación cantidad de muestra/volumen de extractante (s/V), se procedió a evaluar la influencia de dos variables experimentales de gran relevancia en la extracción por MAE, como son la **temperatura** y el **tiempo de extracción**. Así, en primer lugar, se empleó un diseño experimental tipo Box-Behnken para determinar las condiciones experimentales (T y t) que maximizaban

(i) la concentración de compuestos bioactivos seleccionados (betulina, ácido betulínico, betulósido, un isómero del betulósido, tres isómeros del 1-pentosil-betulósido, catequina, β -sitosterol, lupeol y pentosil-catequina) expresada en mg g^{-1} muestra ($R1$), (ii) la selectividad en la extracción de estos compuestos debido a la menor coextracción de compuestos interferentes (expresada en mg g^{-1} de extracto seco, $R2$) y (iii) la actividad anti-lipasa ($R3$), por ser esta bioactividad la menos estudiada en extractos de abedul.

La **Tabla 3.1** muestra los resultados obtenidos para cada una de estas respuestas ($R1$ - $R3$) en los diferentes experimentos considerados en el diseño experimental. Como cabía esperar, la amplitud del rango de variación asociado a las distintas condiciones experimentales ensayadas, resultó dependiente en gran medida de la variable respuesta considerada, por lo que se procedió en primera instancia a optimizar de forma independiente cada una de estas respuestas. Se aplicó una metodología de superficie de respuesta para el cálculo de los coeficientes de los modelos cuadráticos propuestos y la estimación de la significación estadística de los coeficientes de regresión.

En cuanto al rendimiento de extracción, la ecuación del modelo resultó ser $R1 = 6,75 + 0,078 T + 0,0524 t - 0,000196 T^2 - 0,000442 Tt - 0,000789 t^2$, ($R^2 = 78\%$), siendo $150\text{ }^\circ\text{C}$ y 5 minutos las condiciones que maximizaban el contenido en mg g^{-1} muestra de los compuestos seleccionados en extractos de abedul. Por su parte, la mayor selectividad de la extracción (datos en mg g^{-1} extracto seco) se consiguió a $50\text{ }^\circ\text{C}$ y 5 min, siendo la ecuación del modelo $R2 = 332,282 - 2,983 T - 3,533 t + 0,010 T^2 + 0,0271 Tt - 0,000256 t^2$ ($R^2 = 91\%$). Por último, y considerando la actividad inhibidora de lipasa pancreática ($R3$), temperaturas bajas y tiempos de extracción intermedios ($50\text{ }^\circ\text{C}$ y 16 minutos) fueron las condiciones que maximizaron la bioactividad de los extractos de abedul, siendo la ecuación del modelo para esta respuesta $R3 = 88,538 + 0,0627 T - 0,616 t - 0,00127 T^2 + 0,0008Tt - 0,0203 t^2$ ($R^2 = 92\%$). Es de destacar también que los tres modelos cuadráticos propuestos describieron apropiadamente la variabilidad de estas respuestas.

Tabla 3.1. Concentración, expresada tanto en mg g⁻¹ muestra (*R1*) como en mg g⁻¹ extracto seco (*R2*), de compuestos seleccionados y porcentaje de inhibición de lipasa pancreática (% I_{lipasa}, *R3*) de los extractos MAE obtenidos en distintas condiciones experimentales de acuerdo a un diseño de experimentos Box–Behnken y empleando 0,5 g de corteza BP1 y 10 mL de metanol. Los datos se muestran como valor medio para *n* = 3 replicados y desviación estándar entre paréntesis.

Experimento	<i>T</i> (°C)	<i>t</i> (min)	Compuestos seleccionados		<i>R3</i> (% I _{lipasa})
			<i>R1</i> (mg g ⁻¹ muestra)	<i>R2</i> (mg g ⁻¹ extracto seco)	
1	50	17,5	10,3 (0,6)	161 (30)	98
2	50	30,0	10,3 (0,8)	145 (17)	88
3	100	17,5	11 (2)	110 (14)	85
4	50	5,0	10,4 (0,8)	202 (62)	89
5	100	5,0	13 (5)	132 (7)	87
6	100	30,0	12,8 (0,1)	115 (19)	86
7	150	17,5	14 (4)	136 (38)	75
8	150	30,0	12 (1)	116 (18)	74
9	150	5,0	13,3 (0,5)	105 (6)	73

Puesto que el objetivo del diseño experimental llevado a cabo era tanto maximizar el rendimiento como la selectividad de la extracción MAE de compuestos bioactivos, y teniendo en cuenta que los modelos cuadráticos obtenidos para *R1* y *R2* mostraban condiciones óptimas muy dispares (altas temperaturas daban lugar a una mayor recuperación de compuestos bioactivos pero minimizaban la pureza de los extractos al incrementarse la coextracción de otros compuestos no deseados como los LMWC), se decidió evaluar el tratamiento con levaduras (*S. cerevisiae*) para disminuir la concentración de estos interferentes en los extractos de abedul. Este procedimiento biotecnológico ha sido previamente aplicado para la eliminación selectiva de LMWC en extractos vegetales, sin afectar a su contenido en compuestos bioactivos (Ruiz-Aceituno y col., 2013). Así, en primer lugar, se exploró dicha estrategia para la eliminación selectiva de estos interferentes en las condiciones previamente descritas en el apartado

3.2.8 de Materiales y Métodos. De esta forma, a la hora de seleccionar las condiciones óptimas de extracción, se concedería mayor peso al rendimiento en la extracción ($R1$) frente a la mayor pureza en compuestos bioactivos ($R2$).

La comparación de los resultados correspondientes a un extracto de abedul BP1 incubado con *S. cerevisiae* y una muestra control (extracto no sometido al tratamiento con levaduras) puso de manifiesto que dos horas era suficiente para conseguir la hidrólisis prácticamente completa de la sacarosa, obteniéndose cantidades residuales mínimas de glucosa y fructosa, y preservándose el contenido en betulósido y catequina. Como contrapartida, este tratamiento, además de ocasionar pérdidas significativas (en el rango 60-90%) para algunos de los compuestos de interés (betulina, lupeol y β -sitosterol, ácido betulínico y 1-pentosil-derivado de glicósido), generaba como resultado del metabolismo de las levaduras concentraciones apreciables de trehalosa, glicerol, etc

Dado que este procedimiento de limpieza de los extractos implicaba la evaporación del disolvente extractante (metanol) y posterior redisolución del residuo en agua previo a la incubación con levaduras, se procedió a descartar las limitaciones en cuanto a solubilidad en agua como causa de las pérdidas observadas para algunos de los compuestos de interés (e.g. betulina). A la vista de estos resultados, y teniendo en cuenta que la variación estimada a partir de los datos de la **Tabla 3.1** para extracciones llevadas a cabo a un tiempo fijo (17,5 min) pero en condiciones extremas de temperatura (experimentos 1 y 7: 50 y 150 °C, respectivamente) daban lugar a unas diferencias máximas relativamente bajas (del 27%) en cuanto a rendimiento de extracción, se decidió obviar el tratamiento de purificación previamente descrito y conceder un mayor peso tanto a la pureza ($R2$) como a la bioactividad ($R3$) a la hora de seleccionar las condiciones óptimas de extracción mediante un análisis de respuesta múltiple. Así, la maximización de forma simultánea de las respuestas $R2$ y $R3$ dio lugar a una función de deseabilidad $R_D = 0,81$ y a unas condiciones óptimas de extracción de 50 °C y 13 minutos.

Similares condiciones en cuanto a temperatura han sido también descritas como óptimas por Qi-he y col. (2009) para la extracción por UAE de betulina a partir de corteza de *B. papyfera*, empleándose en este último caso un tiempo de extracción mucho mayor (3 horas vs 13 minutos).

Tras la selección de la temperatura y tiempo de extracción óptimos, se procedió a evaluar la influencia del **número de ciclos** (C1-C3) en cuanto a la extracción exhaustiva de compuestos bioactivos de corteza de abedul (**Figura 3.12**). Así, el porcentaje de compuestos seleccionados extraídos tras C2 y C3 (5% y 0,8%, respectivamente) se consideró despreciable respecto al rendimiento obtenido en C1 (94,2%). Por tanto, el método MAE optimizado para la obtención de extractos bioactivos de corteza de abedul incluyó un único ciclo de extracción a 50°C durante 13 minutos.

Cabe señalar que la similitud entre los valores experimentales determinados en las condiciones óptimas ($R2 = 269,6 \text{ mg g}^{-1}$ peso seco y $R3 = 99\%$) y los predichos ($R2 = 279,4 \text{ mg g}^{-1}$ peso seco y $R3 = 94\%$) ponen de manifiesto que los modelos previamente descritos resultan adecuados para explicar el proceso de extracción de los compuestos bioactivos seleccionados.

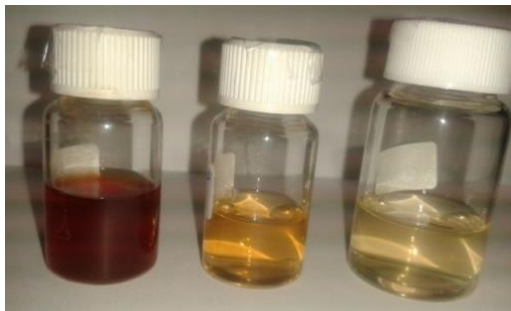


Figura 3.12. De izquierda a derecha: Primer, segundo y tercer ciclos (C1-C3) de extracción en las condiciones MAE previamente optimizadas (0,5 g muestra : 10 mL metanol, 50 °C y 13 min).

3.3.2. Caracterización y estudio de la bioactividad del extracto MAE obtenido a partir de la muestra BP1

3.3.2.1. Composición en terpenoides bioactivos

Las **Tablas 3.2 y 3.3** muestran, respectivamente, la composición expresada tanto en mg g^{-1} de muestra como en mg g^{-1} de extracto seco del extracto de corteza de abedul BP1 obtenido en las condiciones MAE previamente optimizadas.

Como ya se ha comentado previamente, las limitaciones en cuanto a antecedentes sobre la caracterización multicomponente de extractos de abedul hace difícil la evaluación de los resultados obtenidos en el presente trabajo para muchos de los compuestos de interés en el presente estudio. Así, y en cuanto al rendimiento de extracción, los valores experimentales aquí determinados para betulina, ácido betulínico y lupeol (26,5%, 0,61% y 1,28%, respectivamente (valores de la **Tabla 3.2** expresados en % relativo)) son similares a los previamente descritos por Laszczyk y col. (2006) para extractos obtenidos por PLE (120 °C, 5 ciclos x 2 min, 100 bar, 8 g muestra seca: 170 mL acetato de etilo) a partir de corteza de *B. pendula* Roth o *B. pubescens* Ehrh (betulina: 10,5-18,3%, ác. betulínico: 0,5-1,3%, lupeol: 0,9-2,1%).

Por otra parte, y en cuanto a la concentración de betulina determinada en el extracto MAE seco de BP1 (33,1%), relacionada con la selectividad de la extracción, cabe señalar que resultó ligeramente superior a la previamente descrita por Qi-he y col. (2009) para un extracto de *Betula platyphylla* china obtenido por UAE haciendo uso de una sonda de US (23,17%), así como a la obtenida por MAE haciendo uso de diversos ILs (30,0-31,7%; (Ressmann y col., 2012). Contenidos de betulina entre el 20-30%, dependiendo de la especie de abedul, se han descrito también para los extractos PLE etanólicos obtenidos a altas temperaturas (Co y col., 2009). De forma similar, y en comparación con los resultados del presente estudio, los contenidos de este compuesto determinados por Diouf y col. (2009) en extractos MAE al 95% etanol de *B. alleghaniensis* Britton resultaron notablemente inferiores cuando se consideró, tanto la corteza exterior como la interior, como residuo a revalorizar (10,2 y 4,8 mg betulina g⁻¹ extracto seco, respectivamente). Por el contrario, los niveles de lupeol en corteza externa en estos extractos (92,1 mg g⁻¹ extracto seco) fueron muy superiores a los determinados en el extracto MAE de BP1 (3,2 mg g⁻¹ extracto seco). Estos resultados ponen de manifiesto la importancia tanto de la técnica de extracción seleccionada, como de la especie y tejido de abedul considerados, cuando se pretende obtener extractos ricos y estandarizados en cuanto a su composición en compuestos bioactivos.

Tabla 3.2. Composición (en mg g⁻¹ muestra) de los extractos MAE de muestra BP1 obtenidos en las condiciones previamente optimizadas (50 °C, 13 min, 1 ciclo). Los datos se muestran como valor medio para *n* = 3 replicados y desviación estándar entre paréntesis.

Compuesto	mg g⁻¹ de muestra
Fructosa	0,67 (0,05)
Glucosa	0,67 (0,05)
Sacarosa	0,25 (0,02)
Isómero del betulósido	0,080 (0,006)
Betulósido	3,98 (0,03)
Catequina	0,264 (0,004)
β -Sitosterol	0,051 (0,003)
Lupeol	0,25 (0,02)
1-Pentosil-derivado de glicósido	0,18 (0,01)
1-Pentosil-betulósido (isómero I)	0,14945 (0,00005)
1-Pentosil-betulósido (isómero II)	5,4 (0,5)
Betulina	5,2 (0,5)
1-Pentosil-betulósido (isómero III)	1,55 (0,05)
Ácido betulínico	0,12 (0,03)
Pentosil-catequina	0,80 (0,09)

Tabla 3.3. Composición (en mg g⁻¹ extracto seco) de los extractos MAE de muestra BP1 obtenidos en las condiciones previamente optimizadas (50 °C, 13 min, 1 ciclo). Los datos se muestran como valor medio para *n* = 3 replicados y desviación estándar entre paréntesis.

Compuesto	mg g⁻¹ de extracto seco
Fructosa	12,5 (1,2)
Glucosa	12,3 (1,8)
Sacarosa	3,94 (0,08)
Isómero del betulósido	1,23 (0,04)
Betulósido	61,2 (0,9)
Catequina	3,2 (0,1)
β -Sitosterol	0,59 (0,03)
Lupeol	3,2 (0,3)
1-Pentosil-derivado de glicósido	2,3 (0,2)
1-Pentosil-betulósido (isómero I)	1,6 (0,2)
1-Pentosil-betulósido (isómero II)	67,4 (0,9)
Betulina	99,6 (5,2)
1-Pentosil-betulósido (isómero III)	21,1 (2,4)
Ácido betulínico	2,2 (0,1)
Pentosil-catequina	8,3 (1,4)

3.3.2.2. Actividad antilipasa

Aunque existen numerosos estudios sobre las actividades antivirales, anticancerígenas, anti-inflamatorias, antioxidantes, etc. de los extractos de corteza de abedul (Krasutski y col., 2006; Rastogi y col., 2015), la información referente a su actividad anti-lipasa es mucho más limitada. Así, Slanc y col. (2009) describieron un porcentaje de inhibición de esta enzima inferior al 40% para los extractos hidroalcohólicos de hojas de *B. pendula* Roth obtenidos mediante un procedimiento combinado de sonicación y maceración, siendo estos resultados inferiores al obtenido para el extracto MAE BP1 en el presente estudio ($I_{lipasa} = 99\%$). Por otra parte, en un estudio llevado a cabo por Ado y col. (2013) en el que se evaluó la actividad anti-lipasa de los extractos 80% metanólicos de un total de 98 plantas de Malasia, entre las que no

se incluyeron especies del género *Betula*, se determinó que sólo el 19% de las muestras estudiadas dieron lugar a un porcentaje de inhibición de la lipasa $\geq 80\%$, obteniéndose los mejores resultados (equivalente a $0,11 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Orlistat) para los extractos de frutos de *Averrhoa carambola* y de hojas de *Archidendron jiringa*, *Cynometra cauliflora* y *Aleurites moluccana*. Estos resultados son del mismo orden que los correspondientes al extracto MAE obtenido en condiciones óptimas a partir de corteza de muestra BP1 (equivalente a $0,17 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Orlistat). Más recientemente, Zhang y col. (2015) evaluaron la actividad anti-lipasa de extractos obtenidos mediante extracción sólido-líquido (70% metanol con 0,1% HCl) de lentejas de veinte cultivares, obteniéndose valores de concentración que inhibían el 50% de la actividad de la lipasa (IC_{50}) en el rango $6-10 \text{ mg mL}^{-1}$, siendo estas concentraciones muy superiores a la determinada para el extracto MAE de corteza de abedul obtenido en condiciones óptimas ($\text{IC}_{50} = 0,188 \text{ mg mL}^{-1}$). Por último, y en comparación con la bioactividad determinada para patrones puros, se han descrito valores de IC_{50} de entre 20 y $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ para distintos compuestos fenólicos (Zhang y col., 2015) y de $9,64 \mu\text{g mL}^{-1}$ para el ácido betulínico (Ríos y col., 2018), valor este último muy similar al contenido experimentalmente determinado en el presente estudio y correspondiente a la concentración de extracto que daba lugar a una inhibición del 50% de la actividad de la lipasa pancreática ($9,53 \mu\text{g mL}^{-1}$). Es necesario señalar, sin embargo, que el poder atribuir la bioactividad de un extracto a un único compuesto requiere llevar a cabo experimentos adicionales que descarten el efecto sinérgico asociado a la presencia de otros compuestos bioactivos. En esta Tesis, dichos experimentos no se han llevado a cabo puesto que la práctica habitual cuando se pretende la obtención de extractos multifuncionales a escala industrial es considerar el extracto original y obviar etapas de purificación que, además de encarecer el proceso, no supongan una mejora significativa en la bioactividad.

3.3.2.3. Contenido en polifenoles totales

El TPC y la actividad antioxidante del extracto MAE obtenido a partir de la muestra BP1 en las condiciones previamente optimizadas se determinó, tal y como se describe en las secciones 3.2.5 y 3.2.6. Mediante el ensayo DPPH·, la actividad antioxidante del extracto BP1 resultó ser de $9,13 \text{ mg TE mL}^{-1}$. Por su parte, el TPC de dicho extracto resultó ser de $4,56 \text{ mg GAE mL}^{-1}$. Dadas las limitadas referencias en las

que se aborda la evaluación del carácter antioxidante de extractos de abedul, así como los distintos métodos y compuestos de referencia empleados, la comparación de los resultados experimentalmente obtenidos en este estudio con datos de la bibliografía no fue posible. Sin embargo, es un hecho constatado por distintos autores (Diouf y col., 2009; Co y col., 2009; St-Pierre y col., 2013), que el empleo de técnicas avanzadas de extracción como MAE, UAE, etc. da lugar a extractos con una actividad antioxidante notablemente superior a la de extractos obtenidos por técnicas convencionales como la maceración, dada su mayor eficacia de extracción. Por otra parte, y de forma similar a lo observado en el presente estudio para extractos MAE, se ha descrito que bajas temperaturas, como las empleadas en este estudio, daban lugar a extractos PLE de corteza de *B. pendula* y *B. pubescens* con mayor actividad antioxidante (Co y col., 2009).

3.3.2.4. Evaluación de la viabilidad celular

Para evaluar la potencial aplicación de los extractos MAE de corteza de abedul como ingredientes funcionales de alimentos, entre otros usos, es necesario asegurar que los distintos componentes presentes en estos extractos no comprometen su seguridad. Con este fin, se llevó a cabo una evaluación *in vitro* de la viabilidad celular de acuerdo al ensayo de tinción del Cristal Violeta, y tomando como modelo células Caco-2, tal y como se describe en la sección 3.2.7.

Como puede observarse en la **Figura 3.13**, los valores medios observados para la tasa de supervivencia celular tras el tratamiento con el extracto BP1 fueron en todos los casos próximos al 100%, no observándose diferencias significativas ($p < 0,05$) en el conteo celular en función de la concentración en compuestos bioactivos, lo que confirmaría la seguridad de los extractos MAE en el intervalo de concentraciones ensayado. Además, cabe señalar que la concentración correspondiente al IC_{50} de actividad antilipasa ($50,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ de compuestos bioactivos equivalente a una concentración total de $0,188 \text{ mg mL}^{-1}$) determinada para el extracto MAE de BP1 quedaría incluida en el rango no tóxico.

Si bien son limitados los estudios en los que se aborda la evaluación de la toxicidad de extractos de abedul, las conclusiones obtenidas son, en general, prometedoras respecto a su seguridad. En este sentido, los resultados obtenidos para los extractos MAE de corteza BP1 son concordantes con la baja toxicidad subcrónica descrita por Jäger y col.

(2008) y determinada en un ensayo con perros y ratas para extractos orgánicos apolares de corteza exterior de *B. alba* ricos en triterpenoides. Del mismo modo, se ha descrito que compuestos mayoritarios en extractos UAE y MAE de corteza exterior de *B. alleghaniensis* Britton como la betulina y ácido betulínico poseen, tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*, una baja o incluso nula citotoxicidad en dosis estándar ($< 10 \mu\text{M}$), próximas a las correspondientes al IC_{50} de actividad antilipasa (Ríos y Máñez, 2018).

Otros autores como Diouf y col. (2009) han descrito una disminución de la viabilidad celular en los ensayos llevados a cabo con extractos etanólicos de *Betula alleghaniensis* Britton obtenidos por maceración y UAE, en concentraciones superiores a $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para las que se ha descrito un porcentaje de inhibición de la actividad antioxidante en el rango 93-100%. Como se ha comentado previamente, las distintas especies de abedul, ensayos y líneas celulares, técnicas de extracción, etc. empleados en cada estudio podrían explicar las ligeras diferencias observadas. Además, es necesario señalar que dada la excelente bioactividad de los extractos obtenidos en el presente estudio, es posible llegar a un compromiso entre las concentraciones de extracto que muestran una apreciable bioactividad y que aseguren también la seguridad de su consumo.

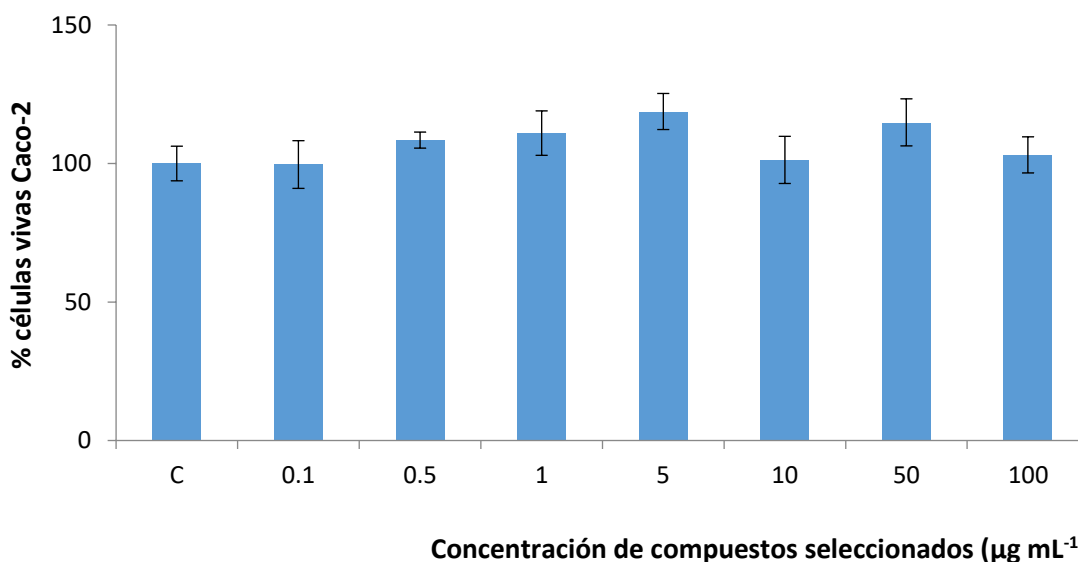


Figura 3.13. Porcentaje de células Caco-2 que sobreviven al ser tratadas con diferentes concentraciones (control (c), 0,1-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de compuestos bioactivos de un extracto MAE obtenido a partir de corteza de *B. pendula* (muestra BP1).

3.3.2.5. Estabilidad durante el almacenamiento

Un requisito fundamental a la hora de evaluar el potencial de aplicación de un extracto con propiedades bioactivas es asegurar que su composición y, por tanto, su bioactividad se mantienen estables en las condiciones de almacenamiento elegidas hasta su consumo. Por este motivo, el extracto MAE de BP1 obtenido en condiciones óptimas se sometió a un almacenamiento en condiciones aceleradas (50 °C, 1 mes) y en condiciones más próximas a las comúnmente utilizadas en el caso de nutraceúticos y otros productos derivados de plantas, como son a temperatura ambiente (22 ± 5 °C) durante 1 año.

En las **Figuras 3.14** y **3.15** se muestra el contenido tanto de compuestos bioactivos seleccionados como de LMWC, determinado en los dos almacenamientos previamente descritos. Como se muestra en la **Figura 3.14**, no se observaron diferencias significativas en el contenido en compuestos bioactivos transcurrido un mes de almacenamiento a 50 °C, ni para las muestras almacenadas a 22 °C durante un año (ver **Figura 3.15**). De forma similar, el contenido en LMWC resultó estable a lo largo de los dos almacenamientos ensayados. Podemos concluir así que los extractos MAE metanólicos obtenidos a partir de corteza de abedul son estables en cuanto a su composición y, por tanto, en sus propiedades bioactivas, pudiéndose incluso utilizar como ingredientes bioactivos en productos sometidos a almacenamiento o procesados bajo condiciones suaves de temperatura.

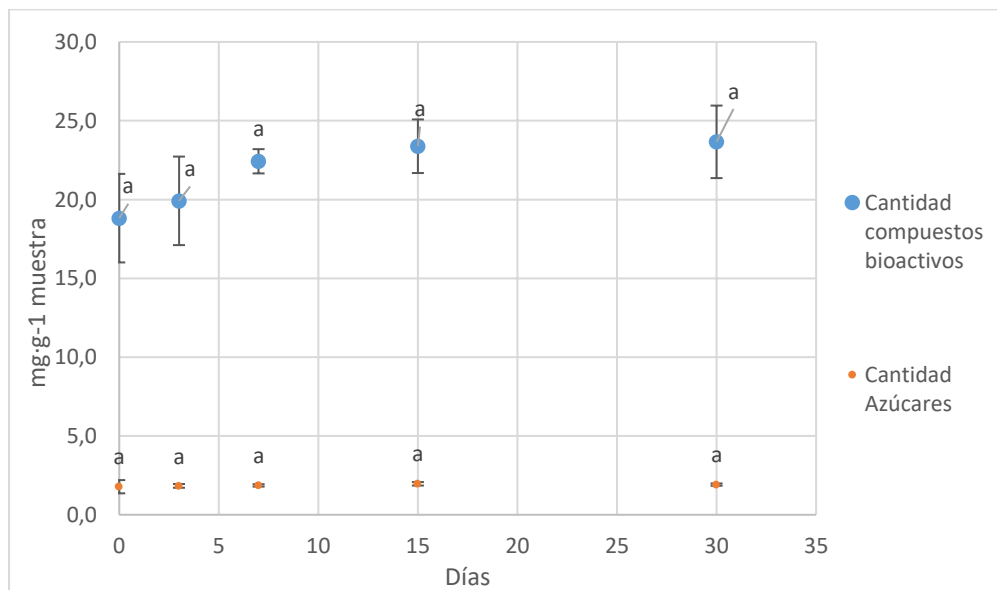


Figura 3.14. Concentración de carbohidratos y compuestos bioactivos seleccionados del extracto MAE de la muestra BP1 almacenado a 50 °C durante 1 mes.

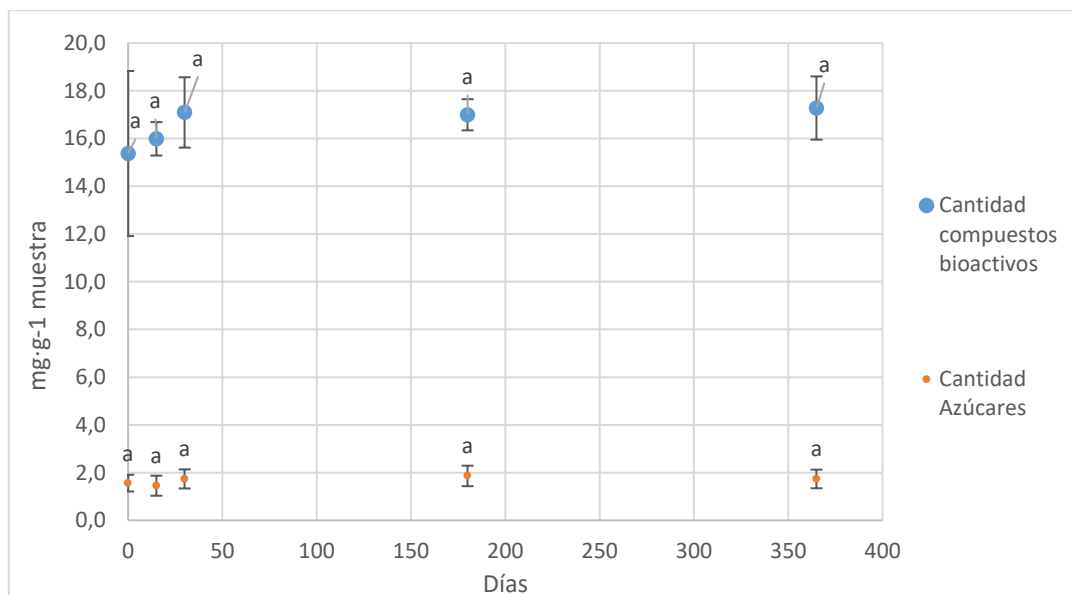


Figura 3.15. Concentración de carbohidratos y compuestos bioactivos seleccionados del extracto MAE de la muestra BP1 almacenado a 22 °C durante 1 año.

3.3.3. Aplicación del método MAE optimizado a distintas muestras de corteza de abedul

Una vez optimizado el método de extracción MAE y, como ejemplo de aplicación, se llevó a cabo la extracción de distintas muestras de corteza de abedul. Dadas las dificultades en la adquisición de muestras comerciales de corteza de *B. pendula*, se incluyeron en este estudio cortezas de otras especies de abedul (*B. alba*, *B. verrucosa*, etc.), así como muestras que incluían cortezas de varias especies.

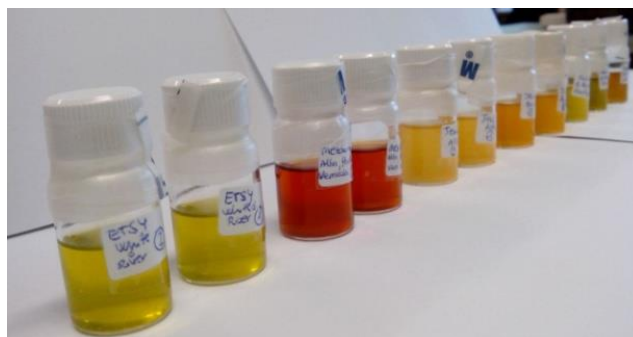


Figura 3.16. Extractos MAE obtenidos en condiciones óptimas para las distintas muestras de corteza de abedul descritas en la sección 3.2.1.

Las **Tablas 3.4 y 3.5** muestran, respectivamente, el rendimiento (datos en mg g^{-1} muestra) y la selectividad (datos en mg g^{-1} extracto seco) de la extracción MAE en condiciones óptimas de las muestras BP2-BP6. La actividad antilipasa determinada para cada uno de dichos extractos se muestra en la última fila de la **Tabla 3.4**.

Como cabía esperar, el rendimiento de extracción resultó dependiente en gran medida del compuesto y muestra considerados. Así, y a modo de ejemplo, rendimientos de betulina de entre 8,2-24,7 mg g^{-1} muestra se obtuvieron para las muestras BP3 (*B. pendula*), BP5 (*B. alba*) y BP6 (mezcla de *B. pendula*, *B. alba* y *B. verrucosa*), mientras que la muestra BP2 (*B. alba*) fue la que presentó un contenido superior en ácido betulínico (1,87 mg g^{-1} muestra) y lupeol (2,2 mg g^{-1} muestra). Otros compuestos como la catequina y el glicósido identificado como pentosil catequina fueron detectados en concentraciones de 2,7 y 2,4 mg g^{-1} en la muestra BP5, respectivamente.

Respecto a la selectividad de la extracción, **Tabla 3.5**, los extractos más puros en cuanto a contenido en betulina fueron los correspondientes a las muestras BP3, BP5 y BP6 (171 -506 mg g^{-1} extracto seco), mientras que contenidos de ácido betulínico superiores a 9,2 mg g^{-1} de extracto seco y de lupeol en el rango 17-36 mg g^{-1} extracto seco se determinaron en las muestras BP2, BP3 y BP6. Otros compuestos bioactivos de interés como la catequina se extrajeron preferentemente (concentraciones $> 22,1 \text{ mg g}^{-1}$ extracto seco) en los extractos correspondientes a las muestras BP4 y BP5.

Por otra parte, y a pesar de la mayor coextracción de LMWC, las muestras BP4-BP6 fueron las que presentaron una mayor actividad antilipasa ($\% I_{\text{lipasa}} = 72-81\%$), no encontrándose una correlación significativa entre dicha bioactividad y la concentración de compuestos cuantificados en las **Tablas 3.4 y 3.5**. Cabe mencionar también que en la muestra BP4 no se detectaron algunos compuestos como la betulina y el ácido betulínico, cuya actividad antilipasa ha sido previamente descrita (Slanc y col., 2009; Tucci y col., 2010). Se atribuye, por tanto, un efecto sinérgico como el responsable de los resultados experimentalmente observados, si bien una comprobación del efecto aislado de los distintos compuestos determinados sería de interés con vistas a la selección de la especie de abedul más adecuada para la obtención de extractos con actividad antilipasa, así como para la requerida estandarización de su bioactividad en su potencial aplicación a escala industrial.

Tabla 3.4. Análisis cuantitativo (datos en mg g⁻¹ muestra) de la composición de extractos MAE obtenidos en las condiciones previamente optimizadas (50 °C, 13 min, 1 ciclo) a partir de las muestras BP2-BP6. Los datos se muestran como valor medio para *n* = 3 replicados y desviación estándar entre paréntesis.

Compuesto	mg g ⁻¹ muestra				
	BP2	BP3	BP4	BP5	BP6
Fructosa	0,019 (0,02)	0,23 (0,01)	1,29 (0,03)	11,3 (0,5)	3,9 (0,1)
Glucosa	0,05 (0,03)	0,103 (0,003)	1,46 (0,02)	10 (1)	7,2 (0,2)
Sacarosa	0,16 (0,02)	0,797 (0,005)	23,6 (0,5)	12,7 (0,1)	1,22 (0,07)
Isómero del betulósido	-	-	0,45 (0,01)	2,1 (0,1)	0,110 (0,005)
Betulósido	-	0,062 (0,003)	2,4 (0,1)	18 (2)	6,4 (0,2)
Catequina	0,0235 (0,004)	0,07 (0,02)	1,54 (0,02)	2,7 (0,1)	0,35 (0,04)
β -Sitosterol	0,111 (0,008)	0,042 (0,002)	0,17 (0,03)	0,145 (0,005)	0,061 (0,009)
Lupeol	2,2 (0,3)	0,58 (0,01)	0,069 (0,003)	0,18 (0,02)	1,2 (0,2)
1-Pentasil-derivado de glicósido	-*	-	0,06 (0,02)	0,21 (0,01)	0,2 (0,1)
Lupenona	-	-	-	tr*	-
1-Pentasil-betulósido (isómero I)	-	-	-	0,51 (0,05)	0,29 (0,07)
1-Pentasil-betulósido (isómero II)	tr*	-	2,72 (0,01)	1,21 (0,02)	3,3 (0,5)
Betulina	4,3 (0,4)	8,2 (0,5)	tr*	10,9 (0,1)	24,7 (0,8)
1-Pentasil-betulósido (isómero III)	-	-	0,0619 (0,0002)	0,52 (0,07)	0,15 (0,02)
Ácido betulínico	1,87 (0,02)	0,588 (0,002)	-	-	0,6 (0,1)
Pentasil-catequina	-	0,1198 (0,0003)	0,811 (0,001)	2,36 (0,02)	0,8 (0,3)
% I lipasa	50	53	72	77	81

*tr: trazas; -: no detectado

Tabla 3.5, Análisis cuantitativo (datos en mg g⁻¹ extracto seco) de la composición de extractos MAE obtenidos en las condiciones previamente optimizadas (50 °C, 13 min, 1 ciclo) a partir de las muestras BP2-BP6. Los datos se muestran como valor medio para *n* = 3 replicados y desviación estándar entre paréntesis.

Compuesto	mg g ⁻¹ extracto seco				
	BP2	BP3	BP4	BP5	BP6
Fructosa	0,29 (0,05)	14 (3)	18 (3)	177 (40)	54 (11)
Glucosa	0,74 (0,1)	6,3 (0,9)	20,94 (3)	156 (33)	94 (17)
Sacarosa	2,45 (0,2)	49 (3)	337 (30)	198 (16)	15,9 (0,9)
Isómero del betulósido	-	-	6,5 (0,5)	33 (5)	47 (5)
Betulósido	-	3,8 (0,1)	34 (2)	288 (14)	1,01 (0,03)
Catequina	0,35 (0,01)	4,2 (0,1)	22,1 (0,6)	43 (2)	4,9 (0,2)
β -Sitosterol	1,7 (0,2)	2,6 (0,2)	2,40 (0,2)	2,3 (0,3)	0,89 (0,1)
Lupeol	32,93 (1)	36 (1)	2,40 (0,06)	2,85 (0,07)	16,9 (0,2)
1-Pentosil-derivado de glicósido	-	-	0,84 (0,07)	3,3 (0,5)	2,8 (0,4)
1-Pentosil-betulósido (isómero I)	-	-	-	8 (1)	4,5 (0,7)
1-Pentosil-betulósido (isómero II)	-	-	38 (2)	18 (1)	74 (4)
Betulina	63 (4)	506 (24)	tr*	171 (14)	322 (19)
1-Pentosil-betulósido (isómero III)	-	-	0,89 (0,09)	8 (2)	40 (7)
Ácido betulínico	27,9 (0,5)	36 (2)	-	-	9,2 (0,4)
Pentosil-catequina	-	7,4 (0,4)	11,6 (0,5)	36 (4)	17 (1)

*tr: trazas; -: no detectado

El método MAE optimizado en esta sección con respecto a los parámetros experimentales más importantes ha demostrado ser una opción prometedora, en cuanto a rapidez y eficacia, para la obtención de extractos multifuncionales de corteza de abedul, contribuyendo además a la revalorización de este residuo como una nueva, y poco explotada hasta el momento, fuente natural de ingredientes bioactivos.

Por otra parte, la remarcable actividad antilipasa y carácter antioxidante de los extractos MAE de abedul en comparación con otras muestras vegetales o con los extractos obtenidos por otras técnicas, les confieren un enorme potencial de aplicación en ámbitos

muy demandados en la actualidad como el de los alimentos funcionales, complementos alimenticios, cosmética natural, etc. Además, la estabilidad y seguridad determinadas para estos extractos son otro factor ventajoso a tenerse en cuenta para su incorporación a alimentos funcionales, complementos bioactivos, etc., susceptibles de ser sometidos a un procesado suave o a un almacenamiento a temperatura ambiente.

Finalmente, el enfoque multicomponente considerado tanto en la extracción como en la caracterización detallada por GC-MS de los extractos MAE de corteza de abedul, constituyen otro de los aspectos novedosos de este trabajo.

EXTRACTOS MULTIFUNCIONALES DE HOJAS DE MENTA

4. DESARROLLO DE NUEVOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS A PARTIR DE HOJAS DE *Mentha* sp.

4.1. PREFACIO

4.1.1. Descripción, propiedades y usos de la menta

El género *Mentha* Linneo pertenece a la familia de las Lamiaceae y comprende 19 especies que crecen en regiones templadas de Europa, Asia, África, Australia y América del Norte (Božović y col., 2015). La hibridación entre algunas especies se da de forma natural y además existen numerosos cultivares. La **Tabla 4.1** muestra un listado de las especies más comunes y de los híbridos reconocidos que se pueden generar por el cruce entre algunas de estas especies.

Tabla 4.1. Algunas especies comunes del género *Mentha* sp. e híbridos generados por el cruce de distintas especies.

Especie	Híbridos
<i>Mentha aquatica</i>	<i>Mentha dumetorum</i> (<i>M. aquatica</i> × <i>M. longifolia</i>)
<i>Mentha longifolia</i>	<i>Mentha piperita</i> (<i>M. aquatica</i> × <i>M. spicata</i>)
<i>Mentha spicata</i>	<i>Mentha villosanervata</i> (<i>M. longifolia</i> × <i>M. spicata</i>)
<i>Mentha suaveolens</i>	<i>Mentha maximiliana</i> (<i>M. aquatica</i> × <i>M. suaveolens</i>)
<i>Mentha arvensis</i>	<i>Mentha rotundifolia</i> (<i>M. longifolia</i> × <i>M. suaveolens</i>)
<i>Mentha crispata</i>	<i>Mentha muelleriana</i> (<i>M. arvensis</i> × <i>M. suaveolens</i>)
<i>Mentha asiática</i>	<i>Mentha dalmatica</i> (<i>M. arvensis</i> × <i>M. longifolia</i>)
<i>Mentha pulegium</i>	<i>Mentha gracilis</i> (<i>M. arvensis</i> × <i>M. spicata</i>)
<i>Mentha cervina</i>	<i>Mentha verticillata</i> (<i>M. arvensis</i> × <i>M. aquatica</i>)
<i>Mentha australis</i>	<i>Mentha smithiana</i> (<i>M. aquatica</i> × <i>M. arvensis</i> × <i>M. spicata</i>)
<i>Mentha requienii</i>	<i>Mentha villosa</i> (<i>M. spicata</i> × <i>M. suaveolens</i>)

La *Mentha* sp. es una planta aromática herbácea perenne que puede alcanzar una altura máxima de aproximadamente 120 cm. Sus raíces son estolones subterráneos y superficiales y se reproducen fácilmente. Las hojas tienen forma oblonga o lanceolada, a menudo con margen dentado. Las flores pueden ser blancas o moradas y el fruto es una cápsula con hasta cuatro semillas (**Figura 4.1**).



Figura 4.1. Hojas, tallo y flores de *Mentha spicata*.

Esta planta aromática es apreciada por su característico aroma refrescante y se utiliza en gastronomía como condimento y aromatizante. Desde la antigüedad, se ha empleado en medicina popular por sus propiedades antiinflamatorias, analgésicas, carminativas, antieméticas, antiferéticas, antiespasmódicas, estimulantes, etc. (Gulluce y col, 2007; Kumar y col., 2011; Riahi y col., 2013). Se ha descrito que tanto los aceites esenciales como los extractos de diferentes especies de menta presentan propiedades antioxidantes (Kamkar y col., 2010) y antimicrobianas frente a distintos microorganismos

como *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, etc. (Scherer y col., 2013; Riahi y col., 2013; Moldovan y col., 2014) y también se emplean con fines astringentes, antisépticos, rubefacientes y para el tratamiento de neuralgias, mialgias, migrañas, etc. (İşcan y col., 2002). Existen también antecedentes que prueban que la *M. spicata* y *M. piperita* L. poseen capacidad antitumorogénica (Arumugam y col., 2010; Yi y Wetzstein, 2011), mientras que la *M. piperita* y *M. aquatica* presentan actividad neuroprotectora (Jäger y col., 2007; Olsen y col., 2008; López y col., 2010) y ésta última actividad antiinflamatoria (Conforti y col., 2008). Todas estas propiedades y aplicaciones han promovido el cultivo de menta como una nueva fuente de ingredientes bioactivos y nutraceuticos, así como su uso para nuevas aplicaciones (e.g. conservantes naturales) en campos como el alimentario, el farmacéutico o el cosmético.

4.1.2. Compuestos bioactivos de menta

Las propiedades bioactivas de las hojas de menta se atribuyen principalmente al contenido en terpenoides y compuestos fenólicos (Riahi y col., 2013). En cuanto a los terpenoides, aunque depende de cada especie, se ha descrito que aproximadamente un 50% lo constituyen monoterpenos y un 10% sesquiterpenos. Otros compuestos tales como aldehidos (10%), lactonas (7%), alcoholes (6%), etc. se encuentran presentes en menor concentración. Los terpenoides más abundantes suelen ser el mentol, la mentona, el acetato de mentilo, etc. Otros terpenoides como carvona, linalool, acetato de linalilo, pulegona, etc. son también mayoritarios en determinadas especies (Brahmi y col., 2017). Entre los compuestos fenólicos se ha descrito la presencia de ácidos como el ácido rosmarínico o el clorogénico, de flavonoides como la apigenina, la luteolina o la rutina, y compuestos derivados de estos (glicosilados, acetilados, etc.). Además, se han detectado también ácidos grasos (e.g. linoleico, linolénico, palmítico), vitaminas (e.g. ácido ascórbico), esteroides (e.g. β -sitosterol) y pigmentos (e.g. xantofilas, carotenos, clorofilas) en menor proporción (Pereira y Cardoso, 2013; Brahmi y col., 2017).

El contenido en compuestos bioactivos de los extractos o de los aceites esenciales obtenidos a partir de hojas de menta está influenciada por diversos factores medioambientales como los métodos de irrigación de la planta, el clima, la época de recogida, etc., pero también por otros factores relacionados con la extracción, como la

técnica empleada y las condiciones de operación (temperatura, tiempo, presión, etc.) (Costa y col., 2014).

4.1.3. Extracción de compuestos bioactivos de hojas de menta

Son muchas las técnicas consideradas para la extracción de compuestos bioactivos de *Mentha* sp., aunque la **hidrodestilación** es una de las más comúnmente utilizadas (Lorenzo y col., 2002; Brada y col., 2006; Gulluce y col., 2007; Riahi y col., 2013; Thach y col., 2013; Gavahian y col., 2015). Esta técnica puede ser aplicada de forma convencional o asistida por ultrasonidos (Gavahian y col., 2015) o microondas (El-Sayed y col., 2018). En estos últimos casos, aunque los rendimientos pueden ser, en ocasiones, similares a los obtenidos mediante hidrodestilación convencional, los métodos son más rápidos y suponen un ahorro energético (El-Sayed y col., 2018).

El empleo de otras técnicas convencionales como la extracción con **Soxhlet** (Gulluce y col., 2007) y la **SLE** (Moldovan y col., 2014; El-Kashoury y col., 2014) ha sido también descrito en la bibliografía para este propósito. En un intento de solventar los principales inconvenientes asociados a los métodos de extracción derivados del uso de estas técnicas, como son los largos tiempos requeridos para el proceso, la degradación de los compuestos termolábiles, los altos volúmenes de disolventes, etc. y de proporcionar un rendimiento mejorado, se han comenzado a aplicar técnicas avanzadas como UAE, MAE o PLE. Sin embargo, los estudios existentes sobre la aplicación de estas técnicas para la extracción de compuestos bioactivos a partir de hojas de menta, así como los estudios comparativos que incluyen diversas técnicas, son hasta el momento muy limitados.

La **UAE** se ha empleado para la extracción de terpenoides bioactivos seleccionados (mentona, mentol y mentofurano) a partir de hojas de *Mentha piperita* (Dai y col., 2010) y de esculetin a partir de hojas de *M. rotundifolia* (Dobiáš y col., 2010). Sin embargo, generalmente las extracciones se llevan a cabo empleando baños de ultrasonidos donde es difícil controlar la temperatura del proceso, siendo pocos los estudios realizados empleando sondas que proporcionan una mayor densidad ultrasónica. Chen y col. (2019) emplearon también un equipo de UAE a alta presión provisto de una sonda de 6 cm de longitud para la obtención de polisacáridos bioactivos de *Mentha haplocalyx*. Por otra parte, la extracción con ultrasonidos se ha combinado también con otras técnicas como la destilación a vacío. En este sentido, Da Porto y Decorti (2009)

optimizaron un método para la extracción, concentración y separación de compuestos volátiles de hojas de diferentes variedades de *Mentha spicata* empleando etanol como disolvente y una sonda de ultrasonidos acoplada a un sistema de destilación a vacío. Los rendimientos de extracción resultaron superiores (0,04-0,13%) a los obtenidos mediante hidrodestilación convencional (0,01-0,02%).

A pesar de las grandes ventajas de la **MAE** expuestas en la Sección 1.3.1 de esta Memoria, esta técnica ha sido escasamente aplicada hasta el momento para la obtención de extractos bioactivos a partir de hojas de menta. Nejati-Yazdinejad y Soozangar (2013) propusieron un nuevo método por MAE para la obtención de extractos con actividad antioxidante a partir de hojas de *Mentha pulegium* cultivada en Iran, mientras que Dai y col. (2010) aplicaron esta técnica para la extracción de tres terpenoides seleccionados (mentona, mentofurano y mentol) a partir de hojas de *Mentha piperita*. En este último trabajo los autores evaluaron la influencia de distintos parámetros de extracción (disolvente, tiempo y relación cantidad de muestra/volumen de disolvente) en los rendimientos obtenidos para cada uno de los tres terpenoides. El disolvente y el tiempo de extracción fueron los parámetros más relevantes. Además, estos autores compararon los rendimientos obtenidos por MAE con los alcanzados por otras técnicas como UAE, SLE y extracción a reflujo, observando que la primera era la más eficaz.

De forma similar, hasta el momento son pocas las referencias bibliográficas existentes sobre el empleo de **PLE** para la extracción de compuestos bioactivos a partir de hojas de menta (Dobiáš y col., 2010; Dawidowicz y Rado, 2010; Rodríguez-Solana y col., 2014). En un estudio de Dobiáš y col. (2010) se evaluó la PLE y UAE para la extracción de compuestos fenólicos seleccionados a partir de diversas plantas, entre ellas, la *M. rotundifolia*, mediante PLE y UAE. Aunque para el caso de la menta únicamente se extrajo esculetin y no se observaron diferencias notables en la concentración de este compuesto en los extractos obtenidos en ambas técnicas, para las otras plantas se extrajo un mayor número de compuestos por PLE, mientras que las concentraciones de dichos compuestos individuales fueron mayores por UAE. Dawidowicz y Rado (2010) compararon la eficacia de distintas técnicas (dispersión de la matriz en la fase sólida (MSPD), PLE y destilación por arrastre de vapor) para la extracción de terpenoides de *M. piperita*, observándose los mejores resultados, principalmente en cuanto a terpinoleno y biciclogermacreno, para PLE y MSPD. Por su parte, Rodríguez-Solana y col. (2014) compararon la eficacia de PLE, Soxhlet y SFE para la extracción de terpenoides y

compuestos fenólicos totales de *M. piperita*, siendo las dos primeras técnicas las que proporcionaron los mejores resultados.

4.1.4. Caracterización analítica de compuestos bioactivos de menta

Como se ha comentado en la sección 3.1.4. para los extractos de corteza de abedul, el empleo de extractos ricos en compuestos bioactivos (terpenoides y compuestos fenólicos en el caso de las hojas de menta) como ingredientes alimentarios o como complementos alimenticios, entre otras aplicaciones, requiere una caracterización previa exhaustiva de su composición.

Si bien la mayoría de estudios sobre el análisis de terpenoides en menta hacen referencia a la composición determinada por GC-MS de aceites esenciales obtenidos por diversas técnicas de destilación, los estudios en los que se aborda el empleo de esta técnica para la caracterización de extractos orgánicos de menta son mucho más limitados (Riahi y col., 2013; Costa y col., 2014). Menos común es también la caracterización por GC-MS haciendo uso de una técnica de aislamiento y preconcentración de compuestos volátiles como la SPME, de dichos extractos (Cirlini y col., 2016).

Por otra parte, son numerosos los estudios centrados en el análisis de compuestos fenólicos totales de estos extractos mediante técnicas espectroscópicas. Sin embargo, son las técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masas, y principalmente la LC-MS, las más adecuadas para el análisis de los distintos compuestos fenólicos presentes en estas muestras, por su alto poder de resolución y capacidad de identificación. Generalmente estos análisis se llevan a cabo empleando columnas de fase inversa (C₁₈) que proporcionan una separación adecuada de los compuestos fenólicos (Moldovan y col., 2014; Taamalli y col., 2015, Cirlini y col., 2016) y analizadores de espectrometría de masas en tándem como el QToF (Taamalli y col., 2015) o las trampas iónicas lineales (Moldovan y col., 2014; Cirlini y col., 2016), que proporcionan ventajas para su identificación. Sin embargo, hasta el momento no existen estudios en los que se aborde la evaluación de la composición de extractos de hojas de menta de distintas especies o de una misma especie recogida en diferentes años, obtenidos bajo unas mismas condiciones experimentales, siendo por tanto difícil la comparación, en cuanto a composición y bioactividad, entre las distintas muestras.

A la vista de lo expuesto, el **objetivo principal de esta sección** fue el desarrollo de nuevos métodos de extracción mediante técnicas avanzadas (**PLE, MAE y UAE**) para la obtención de extractos **multifuncionales** (con actividad antioxidante y antimicrobiana) a partir de hojas de *Mentha* sp. con potenciales aplicaciones como ingredientes o conservantes alimentarios. Para ello fue necesario (i) **optimizar los parámetros experimentales** más relevantes de cada una de las técnicas que afectan al rendimiento de extracción de terpenoides y compuestos fenólicos de hojas de menta; (ii) **comparar** los resultados obtenidos mediante las distintas técnicas y **seleccionar** la más eficaz; (iii) **caracterizar por GC-MS y LC-MS** los extractos de menta obtenidos; (iv) evaluar diferentes **procedimientos de enriquecimiento** [extracción en fase sólida (SPE) y tratamiento con carbón activo (AC)] de los extractos, (v) **aplicar las condiciones óptimas** de la técnica seleccionada a hojas de menta de una misma especie recolectadas en diferentes años de cosecha y de distintas especies y (vi) **evaluar la bioactividad** (actividad antioxidante y antimicrobiana) de los extractos obtenidos bajo las condiciones previamente optimizadas.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Muestras de menta

En la **Tabla 4.2** se recogen las muestras de menta consideradas en este estudio. Se emplearon hojas de *Mentha rotundifolia* cultivadas para experimentación en el Centro de Investigación y Tecnología Agrolimentaria de Aragón (CITA, Zaragoza, España), recolectadas en su periodo de floración en 2014 (MR14), 2015 (MR15), 2016 (MR16) y 2017 (MR17) y proporcionadas por el Dr. Burillo (CITA). Las muestras de hojas de menta de otras especies (*M. spicata*, *M. suaveolens*, *M. longifolia*, *M. pulegium* y *M. cervina*) fueron también recolectadas en su época de floración en diferentes lugares de España. La identificación taxonómica de estas muestras fue confirmada por el Dr. R. Morales (Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid, España). Las muestras se secaron al aire a temperatura ambiente y en ausencia de luz, se molieron en un molinillo doméstico (Moulinex, Barcelona, España) y se tamizaron (< 500 µm) antes de la extracción.

Tabla 4.2. Muestras de menta empleadas en este estudio.

Códigos	Especie	Naturaleza	Procedencia	Año de recolección
MR14	<i>M. rotundifolia</i>	Cultivada	Zaragoza	2014
MR15	<i>M. rotundifolia</i>	Cultivada	Zaragoza	2015
MR16	<i>M. rotundifolia</i>	Cultivada	Zaragoza	2016
MR17	<i>M. rotundifolia</i>	Cultivada	Zaragoza	2017
MSp	<i>M. spicata</i>	Silvestre	Cerezo de Arriba, Segovia	2015
MS	<i>M. suaveolens</i>	Silvestre	Riaza, Segovia	2015
ML	<i>M. longifolia</i>	Silvestre	El Espinar, Segovia	2014
MP	<i>M. pulegium</i>	Silvestre	El Espinar, Segovia	2015
MC	<i>M. cervina</i>	Silvestre	Retuerta del Bullaque, Ciudad Real	2014

4.2.2. Patrones

Los patrones de ácido cafeico, ácido cítrico, ácido clorogénico, ácido *p*-cumárico, *trans*-cariofileno, ácido gálico, ácido gentísico, ácido oxálico, ácido quínico, ácido siríngico, ácido vanílico, catequina, 1,8-cineol, diosmetina, epicatequina, *trans*-ferúlico, galocatequina, hidrato de *cis*-sabineno, ácido 4-hidroxi-benzoico, 3-hidroxi-tirosol, 3-hidroxi-2,4,5-trimetoxiflavona, isoquercitrina, limoneno, β -mirceno, α - y β -pineno, α -terpineol se compraron en Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Los patrones de luteolina-7-*O*-glucósido, ácido salvianólico B, escopoletina, hesperetina, diosmina y eriodictiol se adquirieron en Extrasynthese (Genay Cedex, Francia), mientras que la luteolina fue comprada a Sarsyntex (Merignac, France), el ácido rosmarínico a Cayman Chemical Company (Michigan, USA) y la rutina a Acros Organics (New Jersey, USA). Todos los patrones utilizados fueron de grado analítico (pureza $\geq 95\%$). La piperitenona se obtuvo de acuerdo a un procedimiento de síntesis descrito por Beereboom (1966). Su caracterización estructural se llevó a cabo mediante análisis por MS y Resonancia Magnética Nuclear (RMN), tal y como se describe en Kimbaris y col. (2017). El (+)-óxido de piperitenona fue aislado del aceite esencial de *Mentha spicata* tras un fraccionamiento con gel de sílice (Kimbaris y col., 2017). Su estructura se confirmó mediante GC-MS, $^1\text{H-NMR}$ y $^{13}\text{C-NMR}$ de acuerdo con los datos previamente publicados en la bibliografía (Elings y col., 2000; Ghoulami y col., 2001).

4.2.3. Procedimientos de extracción

4.2.3.1. Selección del disolvente

En primer lugar, y con el fin de seleccionar el mejor disolvente para la extracción de compuestos bioactivos (fenoles y terpenoides) se empleó 1 g de hojas de *Mentha rotundifolia* (MR14) y 10 mL de distintos disolventes: (i) agua de calidad ultra pura (18,2 M Ω cm) producida mediante un sistema Milli-Q Advantage A10 de Millipore (Billerica, MA, USA), (ii) etanol (Scharlau, Barcelona, España), (iii) metanol (Scharlau, España) y (iv) acetona (Carlo Erba, Milan, Italia) de grado analítico. Las muestras se sometieron a un tratamiento por MAE a 75 °C durante 17,5 min. Las concentraciones de piperitenona y óxido de piperitenona, el contenido en compuestos fenólicos totales (TPC) y la actividad antimicrobiana de los extractos MAE (determinados según se indica en las secciones

4.2.4.1, 4.2.6 y 4.2.8, respectivamente) fueron usados como criterio para la selección del disolvente óptimo.

4.2.3.2. Obtención de extractos multifuncionales etanólicos

4.2.3.2.1. Selección de la técnica de extracción

Para la obtención de extractos multifuncionales, empleando etanol (Scharlau) como disolvente, se evaluaron, en primera instancia, los resultados obtenidos por tres técnicas distintas: SLE, UAE y MAE. Las extracciones se llevaron a cabo durante 30 min por triplicado empleando 1g de hojas de *M. rotundifolia* (MR14) y 10 mL de disolvente. Los extractos obtenidos fueron inmediatamente enfriados para detener el proceso de extracción utilizando un baño de agua/hielo antes de ser centrifugados (4990 g durante 10 min, 4 °C) y se almacenaron en congelación a -18 °C hasta su análisis.

➤ **Extracción sólido-líquido (SLE)**

Para la obtención de extractos SLE se utilizó una placa calefactora (IKA Labortechnik, Alemania) con agitación constante y provista de una sonda de control de temperatura. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado a 30 °C y 60 °C. Estas condiciones de operación fueron seleccionadas en base a datos de la bibliografía (Moldovan y col., 2014; El-Kashoury y col., 2014).

➤ **Extracción asistida por ultrasonidos (UAE)**

Los experimentos de UAE ($n = 3$) para la extracción de compuestos bioactivos de la muestra MR14 se llevaron a cabo en un baño de ultrasonidos (Julabo Labortechnik GMBH, Alemania) operando a 35 kHz. La temperatura se monitorizó durante todo el proceso de extracción, siendo ésta inferior a 26 °C.

➤ **Extracción asistida por microondas (MAE)**

De forma similar a como se describe en la sección 3.2.2 para los extractos MAE de corteza de abedul, las extracciones por MAE de hojas de menta se llevaron a cabo en un equipo MARS 6 (CEM, NC, USA) provisto de una sonda de fibra óptica para el control

de la temperatura, haciendo uso de unos vasos X-Press 1500 (CEM) de 100 mL. Para todos los experimentos la potencia del microondas se fijó a 900 W y se realizaron ensayos a 30 °C y 60 °C.

La comparación de la extracción mediante MAE, SLE y UAE se realizó en base al rendimiento de extracción obtenido y a la reproducibilidad del proceso. Para ello se seleccionaron 6 terpenoides (óxido de piperitenona, piperitenona, isopiperitenona, 1,8-cineol, hidrato de *cis*-sabineno y *trans*-cariofileno) cuya presencia en hojas de *M. rotundifolia* se había descrito previamente en la bibliografía (Lorenzo y col., 2002; Brada y col., 2006, Riahi y col., 2013).

4.2.3.2.2. Optimización de condiciones de extracción por MAE para la obtención de extractos multifuncionales etanólicos

En una segunda etapa se estudió, haciendo uso de un diseño de experimentos Box-Behnken, el efecto en la extracción por MAE de hojas de menta de tres factores independientes: temperatura (T , °C), tiempo (t , min) y cantidad de muestra (s , g). Se empleó el equipo MAE comentado en la sección anterior, la muestra MR14 y se consideró un volumen fijo de disolvente de 10 mL. Se llevaron a cabo un total de 15 experimentos en orden aleatorio (diseño factorial de 3 niveles que incluye 3 puntos centrales para estimar el error experimental). Los rangos experimentales de los factores fueron: $T = 50-100$ °C, $t = 5-30$ min, y $s = 0,75-1,5$ g.

El modelo cuadrático propuesto fue:

$$R = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 t + \beta_3 s + \beta_{1,1} T^2 + \beta_{2,2} t^2 + \beta_{3,3} s^2 + \beta_{1,2} Tt + \beta_{1,3} Ts + \beta_{2,3} ts + \varepsilon \quad (\text{Ec. 4.1})$$

donde β_0 es la ordenada en el origen, β_i son los coeficientes de primer orden, $\beta_{i,i}$ los coeficientes cuadráticos para los i factores, $\beta_{i,j}$ los coeficientes de interacción de los factores i y j y ε es el error.

Se consideraron diferentes variables respuesta (R) para la optimización del método MAE: R_t : la cantidad (mg g⁻¹ de muestra seca) de volátiles totales para los 6 terpenoides bioactivos indicados en el apartado anterior (óxido de piperitenona, piperitenona, isopiperitenona, 1,8-cineol, hidrato de *cis*-sabineno y *trans*-cariofileno), y R_x , el

contenido individual de cada uno de estos compuestos (en mg g⁻¹ de muestra seca). Los resultados del contenido en compuestos fenólicos totales (R_{TPC}) y los correspondientes a la actividad antioxidante, medida mediante el ensayo del radical DPPH· (R_{DPPH}), determinados como se describe en la sección 4.2.7.1, también se consideraron respuestas adicionales. Los parámetros del modelo que maximizaban individualmente R_t , R_x , R_{DPPH} y R_{TPC} se estimaron mediante regresión lineal múltiple (MLR) utilizando el software StatGraphics Centurion XV (Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD, EEUU). Dicho software se empleó también para la estimación de una función de deseabilidad (R_D) que permitiera determinar las condiciones MAE que maximizaran simultáneamente diferentes respuestas [valores entre 0 (valor completamente indeseable) y 1 (respuesta completamente deseable o ideal)]. Para una optimización completa del método MAE, se evaluó también el número de ciclos (C1-C3) que maximizaban el rendimiento de la extracción.

4.2.3.3. Obtención de extractos multifuncionales acuosos

4.2.3.3.1. Selección de la técnica de extracción

De forma similar a los extractos etanólicos, en primer lugar, se llevó a cabo un estudio preliminar para la selección de la técnica óptima de extracción (UAE, MAE o PLE) para la obtención de extractos acuosos multifuncionales. En todos los casos se empleó 1 g de muestra (MR14) y 12 mL de agua Milli-Q como disolvente, excepto para el PLE en el que se midió el volumen de disolvente obtenido en cada extracción. Todos los experimentos se realizaron por triplicado a 50 °C (excepto en los casos señalados) durante un tiempo total de 5 min y los extractos se congelaron tras la extracción hasta el momento del análisis. Para la selección de la técnica óptima se evaluó la actividad antioxidante de los extractos por el método del radical libre estable DPPH· (sección 4.2.7.1).

➤ Extracción asistida por ultrasonidos (UAE)

Para la extracción de compuestos bioactivos por UAE se evaluó la eficacia del proceso tanto con un baño como con dos sondas de ultrasonidos de distintas dimensiones.

Baño de ultrasonidos

Se empleó un baño de US (Sonica Sweep System EP 2200 Soltec) a una frecuencia de 45 kHz, provisto de una estructura metálica para sostener tubos falcon de 50 mL. El proceso se llevó a cabo a 45 ± 5 °C.

Sondas de ultrasonidos

Se emplearon dos equipos de US diferentes con sondas de distintas dimensiones, provistos de un sensor de temperatura integrado y control digital de amplitud de onda y tiempo. Ambos equipos operaron en modo pulsado (1 s ON / 1 s OFF) a una frecuencia de 20 kHz y a una amplitud de 30%. Los equipos empleados fueron:

(i) un sonicador Branson Digital Sonifier 450 (Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT) con sonda de US de 12,7 mm de diámetro (Biogen Científica S.L.).

(ii) un sonicador Branson Digital Sonifier 250 con sonda de 3 mm de diámetro (Biogen Científica, S.L.).

En ambos casos la sonda se sumergió en la muestra dispuesta en falcons de 50 mL y la temperatura se controló mediante la colocación de la muestra en un baño de agua/hielo para que no superara los 50 °C.

➤ Extracción asistida por microondas (MAE)

Las extracciones se llevaron a cabo en un equipo MARS 6 (CEM) previamente descrito en la sección 4.2.3.2.1 de esta Memoria. Para todos los experimentos la potencia del microondas se fijó en 900 W.

➤ Extracción con líquidos presurizados (PLE)

Las extracciones se llevaron a cabo utilizando un equipo PSE ONE (PA, USA). La muestra en polvo de hojas de *Mentha rotundifolia* se mezcló con arena de mar lavada (Panreac, Barcelona, Spain) y se introdujo en la celda de extracción entre dos capas de arena de mar en la parte superior e inferior de la celda. La extracción se llevó a cabo a una presión constante de 100 bares y se empleó una purga de nitrógeno (1 min) al final del ciclo de extracción para asegurar la recuperación completa del extracto.

4.2.3.3.2. Optimización de las condiciones de extracción por MAE para la obtención de extractos multifuncionales acuosos

En primer lugar, la optimización del método MAE se centró en la evaluación de la relación cantidad de muestra/volumen de disolvente, llevándose a cabo experimentos con una cantidad fija de menta MR14 (1 g) en forma de polvo seco con 10, 12 y 15 mL de agua Milli-Q.

Una vez seleccionada la relación cantidad de muestra/volumen de disolvente óptimos, se evaluó la influencia sobre la obtención de extractos bioactivos de otros dos factores independientes, la temperatura (T , °C) y el tiempo (t , min) de extracción, utilizando un diseño de experimentos de tres niveles. Los rangos de los factores experimentales evaluados fueron: $T = 50-100$ °C y $t = 5-30$ min. El modelo cuadrático propuesto fue:

$$R = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 t + \beta_{1,1} T^2 + \beta_{2,2} t^2 + \beta_{1,2} T \cdot t + \varepsilon \quad (\text{Ec. 4.2})$$

donde β_0 es la ordenada en el origen, β_i son los coeficientes de primer orden, $\beta_{i,i}$ son los coeficientes cuadráticos para los factores i , $\beta_{i,j}$ son los coeficientes de interacción entre los factores i y j , mientras que ε es el error.

Se consideraron tres variables respuesta (R) en la optimización del método MAE; el contenido en compuestos fenólicos totales (R_{TPC}), la actividad antioxidante en términos de equivalentes de Trolox (R_{DPPH}) y la actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* medida como el halo de inhibición del crecimiento bacteriano (R_{AA}) (secciones 4.2.6, 4.2.7.1 y 4.2.8, respectivamente).

Los parámetros experimentales que individualmente maximizaron R_{TPC} , R_{DPPH} y R_{AA} fueron estimados mediante una regresión lineal múltiple usando el paquete informático estadístico StatGraphics Centurion XV (Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD, USA). Se estimó también la función de deseabilidad (R_D) que proporcionaba las condiciones MAE que maximizaban simultáneamente las tres respuestas previamente mencionadas.

En condiciones óptimas, se evaluó también el efecto del número de ciclos MAE (C1-C3) sobre la extracción de una serie de compuestos fenólicos seleccionados (ácido siríngico, 7-*O*-glucósido de luteolina, ácido rosmarínico y ácido salvianólico B).

Tras la extracción, todos los extractos MAE fueron inmediatamente enfriados utilizando un baño de agua/hielo, posteriormente filtrados utilizando papel de filtro Whatman No. 1 (Sigma-Aldrich) y almacenados en congelación a -18 °C hasta su análisis. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

4.2.3.3.3. Optimización de las condiciones de extracción por PLE

Para la optimización de las condiciones de extracción de compuestos bioactivos de hojas de menta por PLE se seleccionó la muestra MR15. En primer lugar, se optimizó la relación s/V , evaluándose tres cantidades de muestra (0,5, 1,0 y 1,5 g) y midiéndose el volumen de extracto obtenido para cada uno de estos experimentos. La selección de la relación s/V óptima se realizó en base al rendimiento de extracción de cuatro compuestos fenólicos de distinta naturaleza (ácido siríngico, 7-*O*-glucosido de luteolina, ácido rosmarínico y ácido salvianólico B) previamente descritos en la bibliografía en hojas de menta (Hossain y col., 2010; Taamalli y col., 2015; Brahmi y col., 2015).

La posterior optimización de la temperatura (T , °C) y el tiempo (t , min) de extracción se llevó a cabo utilizando un diseño factorial de 3 niveles. Se llevaron a cabo un total de 11 experimentos en orden aleatorio. Los rangos de los factores experimentales evaluados fueron $T = 50-150$ °C y $t = 5-30$ min.

El modelo cuadrático propuesto fue:

$$R = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 t + \beta_{1,1} T^2 + \beta_{2,2} t^2 + \beta_{1,2} Tt + \varepsilon \quad (\text{Ec. 4.3})$$

donde β_0 es la ordenada en el origen, β_i son los coeficientes de primer orden, $\beta_{i,i}$ son los coeficientes cuadráticos para los factores i , $\beta_{i,j}$ son los coeficientes de interacción entre los factores i , j y ε es el error.

Para la selección de las condiciones óptimas de PLE, se evaluaron en primer lugar diferentes variables respuesta (R). Por un lado, se consideró el contenido individual (R_x)

(en mg g⁻¹ de muestra seca) para el grupo de compuestos bioactivos previamente seleccionados (ácido siríngico, luteolín 7-*O*-glucosido, ácido rosmarínico y ácido salvianólico B). Por otro lado, se consideraron respuestas como el contenido en compuestos fenólicos totales (R_{TPC} , sección 4.2.6) y la medida de bioactividad en términos de actividad antioxidante determinada por distintos métodos: método del DPPH (R_{DPPH} ; sección 4.2.7.1) y el método de captación del radical ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS, R_{ABTS} , sección 4.2.7.2).

De forma similar al resto de técnicas previamente mencionadas, los parámetros del modelo que maximizaban individualmente R_x , R_{DPPH} , R_{TPC} y R_{ABTS} , se estimaron mediante regresión lineal múltiple (MLR) utilizando StatGraphics Centurion XV software (Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD, USA).

Por último, se evaluó también el número de ciclos de extracción (C1-C3) que maximizaban el rendimiento de extracción de los compuestos de interés.

4.2.4. Análisis Instrumental

4.2.4.1. Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas

El análisis por GC-MS de los extractos etanólicos de menta ricos en terpenoides bioactivos, obtenidos por SLE, MAE y UAE se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo de gases modelo 6890A acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolar modelo 5973C (ambos Agilent Technologies, CA, USA). Los análisis se llevaron a cabo empleando una columna capilar Zebron ZB-5 (5% fenil-95% dimetilpolixiloxano) (Phenomenex, CA, USA), de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 μm de espesor de fase, utilizando helio a un flujo de aproximadamente 1 mL min⁻¹ como gas portador. La temperatura del horno fue programada de 60 °C a 250 °C con un incremento de 6 °C min⁻¹, manteniéndose a la máxima temperatura durante 30 min. La temperatura del inyector fue de 300 °C y las inyecciones se realizaron tanto en modo splitless (0,5 min), para la determinación de los compuestos presentes en menor concentración, como en modo split (1:20) para la cuantificación de los compuestos mayoritarios.

El modo de ionización del espectrómetro de masas fue de impacto electrónico a (70 eV), registrando en el rango m/z 40–500. La temperatura de la línea de transferencia

y la fuente de ionización fue de 280 y 230 °C, respectivamente. La adquisición de datos se llevó a cabo utilizando el software HPChem Station (Agilent Technologies).

El análisis cualitativo se basó en la comparación de los espectros de masas experimentales con los de la biblioteca Wiley (McLafferty y Stauffe, 1989) y con los datos previamente publicados en la bibliografía (Adams, 2001; Babushok y Zenkevich, 2009), y fue confirmada utilizando los correspondientes índices de retención lineales (I^T) (ecuación 4.4).

$$I^T = 100 \cdot \left[\frac{t_{Ri}^T - t_{Rz}^T}{t_{R(z+1)}^T - t_{Rz}^T} + z \right] \quad (\text{Ec. 4.4})$$

donde t_{Ri}^T es el tiempo de retención del pico cromatográfico del compuesto objeto de estudio; t_{Rz}^T y $t_{R(z+1)}^T$ son, respectivamente, los tiempos de retención de los alcanos que eluyen antes y después del pico cromatográfico correspondiente al compuesto i determinados en idénticas condiciones cromatográficas, y z es el número de átomos de carbono del alcano que eluye antes del pico de interés. Se utilizaron también los patrones disponibles (sección 4.2.2) para confirmar algunas de las identificaciones.

Los datos cuantitativos se obtuvieron utilizando tridecano (0,626 mg mL⁻¹) y tetradecano (3,81 mg mL⁻¹) como patrones internos para cuantificar los compuestos minoritarios y mayoritarios, respectivamente. Los resultados se expresaron en miligramos por gramo de muestra seca (rendimiento de extracción) y en miligramos por gramo de extracto seco (selectividad del extracto). El peso seco de los extractos fue determinado gravimétricamente secando los extractos a 105 °C hasta alcanzar un peso constante.

4.2.4.2. Cromatografía de Líquidos-Espectrometría de Masas

Para el análisis de compuestos fenólicos presentes en los extractos acuosos obtenidos por MAE y PLE se utilizaron dos equipos de LC-MS (ambos de Agilent Technologies). El primero fue un HPLC-UV-MS formado por un HPLC modelo 1200 provisto de un desgasificador, una bomba binaria, un inyector Rheodyne y un horno (Kariba Instruments), acoplado mediante una fuente de ionización por electrospray (ESI),

trabajando en polaridad negativa, a un detector de masas cuadrupolar MSD 1100 (Agilent Technologies).

Los parámetros de operación se detallan a continuación: voltaje del spray: 4 kV, gas (N_2 , pureza del 99,5%) de secado: 300 °C, flujo: 12 L min^{-1} ; presión del gas (N_2 , pureza del 99,5%) nebulizador: 276 kPa y voltaje del fragmentador: 80-100 V.

Los iones cuasimoleculares ($[M-H]^-$) de los compuestos en estudio se registraron en modo monitorización de iones selectivos (SIM). Los datos se adquirieron y procesaron usando el software HPChem Station Rev. A.07.01.

La identificación de los compuestos fenólicos en los extractos MAE de *Mentha* sp. se basó en primer lugar en la comparación de los datos de retención experimentales de compuestos previamente descritos en la bibliografía (Moldovan y col., 2014), con los patrones comerciales disponibles (sección 4.2.2). Para confirmar estas identificaciones y para caracterizar los compuestos desconocidos, se emplearon un cromatógrafo de líquidos acoplado a un espectrómetro de masas tandem (LC-MS²), así como datos de la bibliografía, y cuando estaban disponibles, patrones comerciales. El instrumento empleado fue un Agilent 1200 Series LC acoplado a un detector de masas cuadrupolar de tiempo de vuelo (QToF) 6520 (Agilent Technologies) con una fuente de ionización ESI trabajando en modo negativo. El voltaje del electrospray fue fijado en 4,5 kV y el voltaje del fragmentador a 150 V. Se empleó nitrógeno (99,5 % pureza) como gas nebulizador (207 kPa) y gas de secado (300 °C, 6 L min^{-1}), mientras que se utilizó nitrógeno de pureza superior (99,999%) como gas de colisión. Los espectros de masas tandem se obtuvieron por colisión de disociación inducida (CID), aplicando energías de colisión de entre 10 y 37 eV a los iones precursores seleccionados ($[M-H]^-$). La adquisición y procesado de datos se realizó utilizando el software Agilent Mass Hunter Workstation Acquisition Rev. B.02.00.

La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna analítica de fase inversa Luna C₁₈ (Phenomenex, Cheshire, UK) (100 × 2,0 mm d.i., 3 μm) a un flujo de 0,4 mL min^{-1} . La fase móvil fue una mezcla binaria del disolvente A (agua con 0,1% de ácido acético) y B (acetonitrilo con 0,1% de ácido acético), con el siguiente gradiente: 0 min: 5% B; 20-25 min: 36% B; 35 min: 90% B; 36-50 min: 5% B. El volumen de inyección fue de 5 μL y la tempera de la columna se termostató durante el análisis a 25 °C.

La cuantificación de los compuestos fenólicos se realizó por triplicado utilizando una curva de calibrado (rango de concentraciones de 0,01-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) que incluía las concentraciones de los compuestos de interés. Previo a la aplicación del método, se confirmó la bondad de ajuste de los calibrados así como la reproducibilidad del método. Los resultados se expresan en miligramos por gramo de muestra seca (rendimiento de extracción).

4.2.5. Enriquecimiento en terpenoides bioactivos de los extractos MAE

Con el fin de evaluar el posible enriquecimiento de los extractos etanólicos de menta, se estudió el efecto sobre su composición de dos procedimientos de limpieza: (i) tratamiento con carbón activo (AC) y (ii) la extracción en fase sólida (SPE).

4.2.5.1. Tratamiento con Carbón Activo (AC)

Se mezclaron por triplicado 800 μL del extracto de MR14 obtenido por MAE en las condiciones previamente optimizadas, con 20 mg de carbon activo (Scharlau), mediante agitación en vortex (IKA, Wilmington, USA) a 1200 r.p.m. durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras su centrifugación (81320 g, 4 min), se tomó una alícuota del sobrenadante y se analizó por GC-MS (sección 4.2.4.1).

4.2.5.2. Extracción en fase sólida (SPE)

Los cartuchos de SPE (Sep-Pak[®] Plus C18, Waters, MA, USA) a emplear en este ensayo, se acondicionaron con 15 mL de etanol. A continuación, se cargaron en el cartucho 500 μL del extracto de MR14 obtenido en las condiciones MAE óptimas y se llevó a cabo la elución con 500 μL de etanol. Finalmente, se tomó una alícuota del extracto así obtenido para su posterior análisis de compuestos de interés por GC-MS (sección 4.2.4.1). Los experimentos se realizaron por triplicado.

4.2.6. Contenido total de polifenoles (TPC)

El contenido total de compuestos fenólicos de los extractos MAE se determinó haciendo uso del reactivo Folin-Ciocalteu y empleando como referencia un calibrado de ácido gálico (ambos de Sigma-Aldrich), tal y como se describe en Soria y col. (2010a) con leves modificaciones (sección 3.2.5). Así, en un tubo eppendorf de 1,5 mL se

mezclaron por agitación en vortex una alícuota (100 μL) de los extractos MAE diluídos (1:50-1:175), 100 μL de MeOH (Sigma-Aldrich) y 100 μL del reactivo Folin-Ciocalteu. Tras 5 min, se adicionaron 700 μL de una disolución de Na_2CO_3 (Panreac, Barcelona, Spain) de 75 g L^{-1} y se agitó la mezcla en vortex suavemente.

A continuación, los tubos eppendorf se mantuvieron en oscuridad durante 20 min a temperatura ambiente, se centrifugaron a 13000 r.p.m. durante 3 min y se leyó su absorbancia ($n = 3$) a 750 nm. El mismo procedimiento se repitió con disoluciones acuosas de ácido gálico en un rango de concentraciones de 10-100 mg L^{-1} para construir la requerida curva de calibrado. Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico (GAE) (mg mL^{-1} o mg g^{-1} muestra seca).

4.2.7. Actividad antioxidante

4.2.7.1. Ensayo con el radical libre estable DPPH·

La capacidad antioxidante de los extractos de *Mentha sp.* fue medida ($n = 3$) en términos de donación de hidrógenos o capacidad de captación de radicales, utilizando el radical estable DPPH· (ver sección 3.2.6). Para ello se mezclaron alícuotas de 50 μL de diferentes diluciones (1:20-1:70) de los extratos MAE con 45 μL de una disolución 0,001 M de DPPH· (Sigma-Aldrich) en metanol. Después de 30 min de incubación en oscuridad a 40 °C, la disminución de la absorbancia se leyó a 540 nm. El porcentaje de inhibición del radical libre se estimó empleando la ecuación:

$$I (\%) = ((A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}})/A_{\text{control}}) \times 100 \quad (\text{Ec. 4.5})$$

donde A_{control} es la absorbancia de la reacción control (que contenía todos los reactivos excepto la muestra a evaluar) y A_{muestra} es la absorbancia de la muestra evaluada. La concentración del extracto que da lugar a un 50% de inhibición (IC_{50}) se estimó representando el porcentaje de inhibición $I (\%)$ frente a la concentración de extracto. Como control positivo se utilizó el reactivo antioxidante Trolox (Sigma-Aldrich).

4.2.7.2. Ensayo con ABTS^{•+}

Este ensayo se basa en la inhibición por parte de antioxidantes de la absorbancia del catión radical de ABTS (ABTS^{•+}), un cromóforo estable de color azul-verde, que tiene un espectro de absorción de longitud de onda larga característico (presenta tres máximos a 645 nm, 734 nm y 815 nm) (Shahidi y Zhong, 2015). Para este ensayo, en primer lugar, es necesario generar el radical ABTS^{•+} por reacción del ABTS con persulfato potásico, tal y como se muestra en la **figura 4.2**.

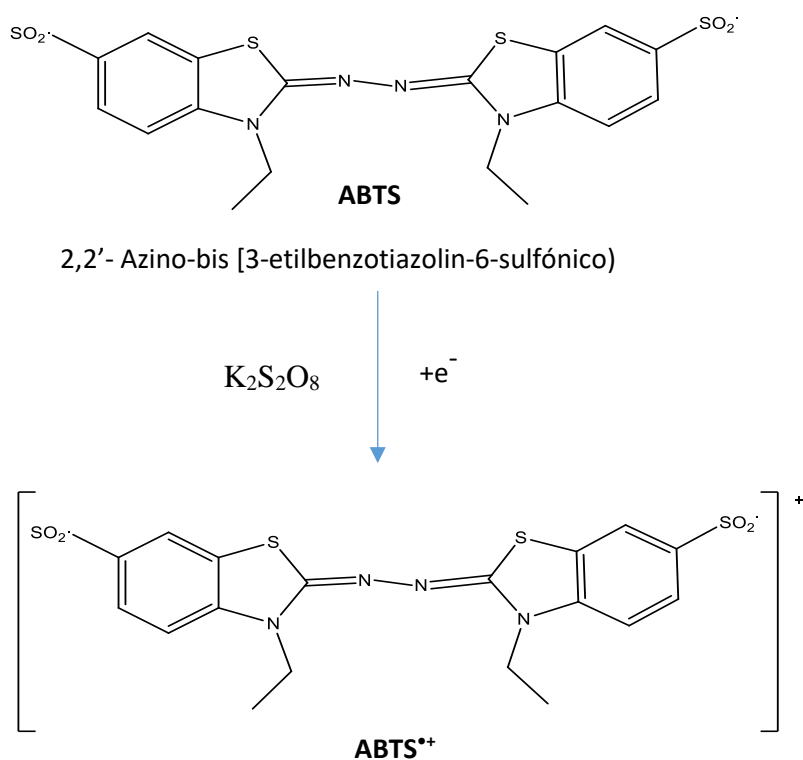


Figura 4.2. Reacción de formación del radical ABTS^{•+}

Posteriormente, la neutralización de estos cationes radicales mediante la transferencia de electrones u átomos de hidrogeno, por parte de compuestos antioxidantes, hace que dicho cromóforo pierda coloración, con la consecuente disminución de la absorción espectrofotométrica. El porcentaje de inhibición de la formación ABTS^{•+} por la muestra o extracto añadido a la reacción permite cuantificar su capacidad antioxidante.

La adaptación de este ensayo para la medida de la bioactividad de extractos de menta se llevó a cabo como se describe a continuación. En primer lugar, se preparó una disolución acuosa de 7 mM de ABTS (Sigma-Aldrich) y de 2,45 mM de K₂S₂O₈ (Sigma-Aldrich), lo que dió lugar a la producción del catión ABTS^{•+}. La oxidación de ABTS comienza de forma inmediata, pero la absorbancia no es máxima y estable hasta el transcurso de un mínimo de 16 h después de la mezcla, por tanto, esta disolución se dejó reposar a 4 °C y en ausencia de luz durante dicho periodo. Tras este tiempo de reposo, el ABTS^{•+} se equilibró a 30 °C y se diluyó con etanol (1:30, v/v) hasta alcanzar una absorbancia de 0,80 (± 0,02) a 750 nm.

A continuación, los extractos de menta se diluyeron en una proporción 1:500 (v/v) con agua Milli-Q. Para las medidas colorimétricas se añadieron a cada pocillo 50 µL de las diluciones de los extractos y 150 µL de la disolución de ABTS^{•+} diluida. El mismo procedimiento se llevó a cabo para el agente antioxidante Trolox (0,005-1 mM) en etanol. Tras la agitación de la mezcla, se determinó su absorbancia ($n = 3$) a 750 nm. Los resultados de este ensayo, al igual que en el ensayo con el DPPH[•], suelen expresarse en equivalentes de Trolox (mM de TE).

4.2.8. Evaluación de la actividad antimicrobiana

Con el fin de evaluar la potencial aplicación de extractos MAE de *Mentha* sp. como conservantes alimentarios de origen natural, se evaluó su actividad antibacteriana frente a bacterias Gram (+) (*Staphylococcus aureus*) y Gram (-) (*Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*) así como frente a la levadura *Candida albicans*. Estas actividades se determinaron mediante el ensayo del disco de difusión tal y como se describe en Palá-Paúl y col. (2012), con ligeras modificaciones. Así, se inocularon en placas Petri 100 µL de una disolución ajustada a una concentración 0,5 MacFarland, de cada uno de los microorganismos en estudio, utilizando el medio de cultivo Mueller Hinton (Sigma-Aldrich) para bacterias Gram (+) y Gram (-) y el medio de agar de dextrosa de patata (PDA, Sigma-Aldrich) para la levadura.

Sobre las placas con los cultivos se colocaron discos de papel de filtro (de 9 mm de diámetro, esterilizados a 121 °C y 1 atm) que fueron impregnados individualmente con 20 µL de los extractos MAE previamente concentrados 15 veces. Como control negativo

se impregnaron los discos únicamente con el disolvente utilizado para la obtención de los extractos (agua, etanol, metanol y acetona).

Tras la inoculación, las placas Petri se refrigeraron a 4 °C durante 15 min para facilitar la difusión de los extractos MAE en el medio de cultivo, y a continuación se incubaron a 35 °C durante 24 h (en el caso de las bacterias) o a 37 °C durante 24 h (en el caso del cultivo de *C. albicans*).

Tras la incubación, se midieron los halos de inhibición de crecimiento y el efecto bacteriostático (disminución del grado de crecimiento bacteriano) en centímetros (incluyendo el diámetro de los discos). Estos ensayos se llevaron a cabo por duplicado.

4.2.9. Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos a diversos análisis estadísticos (t-test y ANOVA (Tuckey test), utilizando el software Statistica 7.0 (StatSoft, Inc. Tulsa, OK, USA). Se consideró $p < 0,05$ como nivel de significación.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se incluyen los resultados correspondientes a la optimización de nuevos métodos para la obtención de extractos multifuncionales a partir de hojas de menta, haciendo especial énfasis en su contenido en terpenoides y compuestos fenólicos, dadas las diversas bioactividades descritas para estos compuestos (Ruiz del Castillo y col., 2004; Scalbert y col., 2005; Diouf y col., 2009; Shukla y Gupta, 2010).

Para la optimización de métodos de extracción considerada en estos estudios, se seleccionó la *Menta rotundifolia* por ser una especie de menta escasamente estudiada y de gran interés en cuanto a sus propiedades bioactivas. Además, las muestras de *M. rotundifolia* consideradas en esta sección han sido cultivada de forma controlada como parte de un estudio llevado a cabo por el Dr. J. Burillo (CITA, Zaragoza, España) sobre la producción de plantas medicinales dentro de un marco de agricultura diversificada y sostenible, estando además disponibles las muestras correspondientes a anualidades consecutivas (2014-2017).

4.3.1. Selección del disolvente

Para seleccionar el disolvente más eficaz para la extracción de compuestos fenólicos y terpenoides a partir de hojas de menta se obtuvieron distintos extractos MAE a 75 °C durante 17,5 min empleando agua Milli-Q, etanol, metanol y acetona. En estos extractos se evaluó el contenido en compuestos fenólicos totales (TPC), el contenido en piperitenona y óxido de piperitenona (terpenoides previamente descritos como más abundantes en hojas de *Menta rotundifolia* (Reitsema y col., 1956; Lorenzo y col., 2002, Riahi y col., 2013) y su actividad antimicrobiana.

El mayor contenido en compuestos fenólicos totales se obtuvo en los extractos de agua seguidos por los de metanol, etanol y por último acetona (4,372, 2,405, 1,202 y 0,515 mg GAE mL⁻¹, respectivamente).

El extracto MAE acuoso fue el único que mostró actividad antimicrobiana frente a las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* y frente a la levadura *Candida albicans*. Independientemente del disolvente considerado, ningún extracto resultó activo frente a *Salmonella typhimurium*. El mayor halo de inhibición del crecimiento bacteriano proporcionado por este extracto acuoso fue para *S. aureus*, siendo de 1,5 ± 0,2 cm. En la

Figura 4.3 se muestran imágenes de las distintas etapas del ensayo para la medida de la actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*.

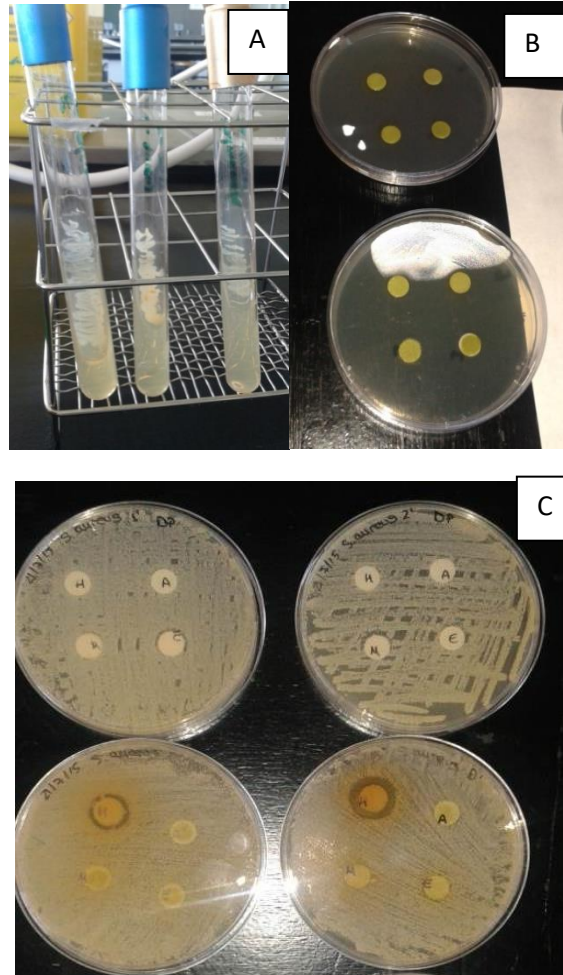


Figura 4.3. (A) Tubos de ensayo con las cepas de las distintas bacterias que se utilizaron en el experimento; (B) placas con las bacterias recién sembradas y los discos de difusión inoculados con los distintos extractos de menta a evaluar (C); Placas con bacterias (*S. aureus*) ya crecidas: la primera fila de placas corresponde al control (por duplicado) de los disolventes (en este orden de izquierda a derecha y de arriba abajo: agua, acetona, metanol y etanol), la fila inferior de placas corresponde a un duplicado del extracto de MR14 concentrado en los distintos disolventes considerados, en el orden previamente comentado.

En cuanto al contenido en piperitenona y óxido de piperitenona, las mayores concentraciones se observaron en el extracto etanólico (0,3 y 1,3 mg g⁻¹ muestra seca, respectivamente).

Por tanto, considerando los resultados obtenidos en cuanto al contenido total de compuestos fenólicos y la concentración de terpenoides, así como de actividad antimicrobiana, y teniendo en cuenta que el uso de disolventes seguros y respetuosos con el medio ambiente es también un valor añadido para la obtención de extractos bioactivos a partir de fuentes naturales para su potencial uso como ingredientes o conservantes alimentarios, se seleccionó el etanol para la obtención de extractos enriquecidos en terpenoides bioactivos, mientras que se eligió el agua como el disolvente óptimo para la obtención de extractos enriquecidos en compuestos fenólicos, con propiedades antioxidantes y antimicrobianas.

4.3.2. Obtención de extractos etanólicos multifuncionales a partir de hojas de menta

4.3.2.1. Selección de la técnica óptima para la extracción de terpenoides bioactivos de menta

Previo al desarrollo de métodos de extracción de terpenoides a partir de hojas de menta, se llevó a cabo la caracterización por GC-MS de un extracto de *M. rotundifolia* (MR14) obtenido por MAE a 100 °C durante 17,5 min, utilizando 1,5 g de muestra seca y 10 mL de etanol (**Figura 4.4**). En dicho extracto, se identificaron/caracterizaron un total de 46 compuestos en base a sus espectros de masas y datos I^T . Las asignaciones y datos cromatográficos correspondientes a los compuestos se muestran en la **Tabla 4.3** y el **Anexo IV** de esta Memoria recoge las estructuras de los compuestos más relevantes. Para aquellos compuestos que no pudieron identificarse inequívocamente, la **Tabla 4.3** muestra las abundancias relativas de sus iones m/z característicos.

-Extractos multifuncionales de hojas de menta-

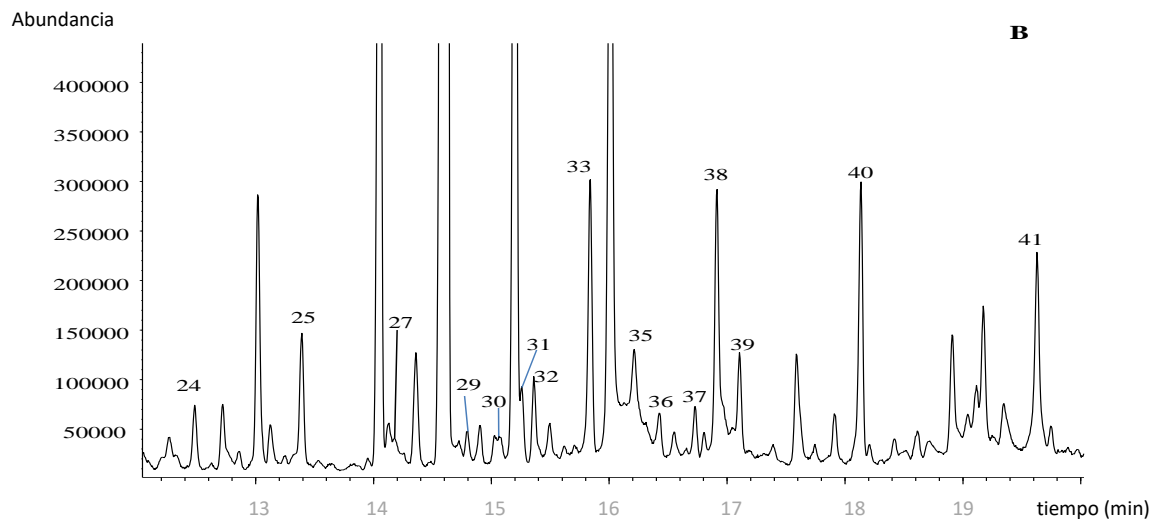
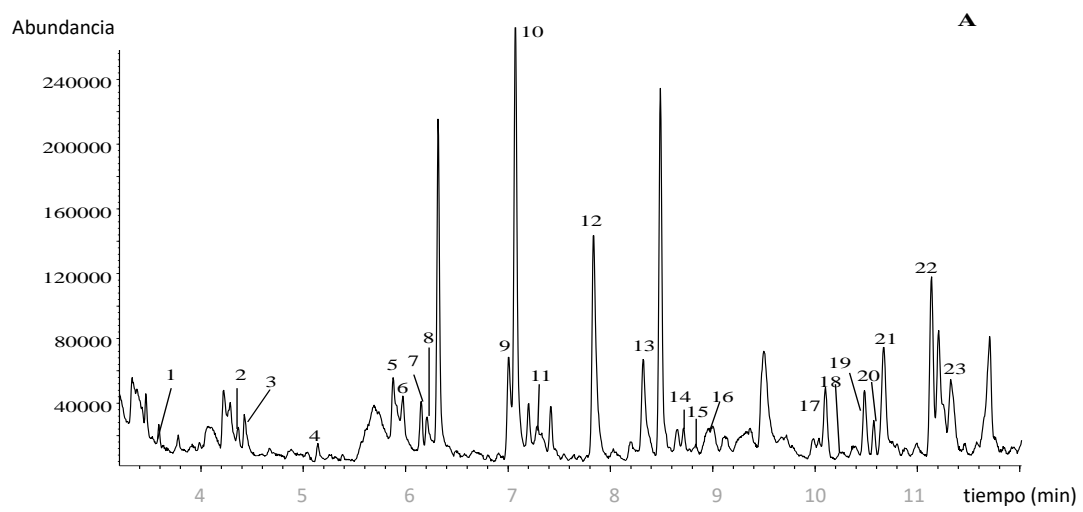
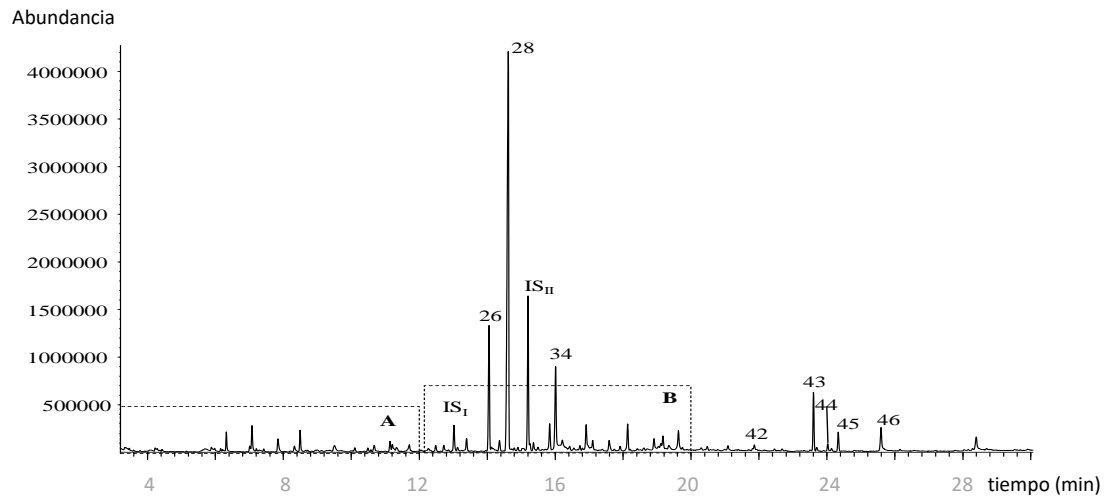


Figura 4.4. Perfil GC-MS de un extracto de *Mentha rotundifolia* obtenido por MAE (100 °C, 17,5 min, 1,5 g muestra seca, 1 ciclo). Para la identificación de picos ver **Tabla 4.3**. Los patrones internos utilizados fueron: IS_I (tridecano) e IS_{II} (tetradecano).

Tabla 4.3: Composición química del extracto de *M. rotundifolia* (MR14) (100 °C, 17,5 min, 1,5 g, 1 ciclo).

Pico Nº.	t_R (min)	Identificación	I^T exp.	I^T bibliografía**
1	3,58	4-Hidroxi-4-metil-2-pentanona	854	851
2	4,36	3-Heptanol	895	892
3	4,43	2-Heptanol	899	896
4	5,14	α -Pino	936	939
5	5,87	1-Octen-3-ol	976	982
6	5,98	β -Pino	981	981
7	6,15	β -Mirreno	991	991
8	6,21	3-Octanol	994	999
9	7,01	Limoneno	1031	1031
10	7,07	1,8-Cineol	1034	1033
11	7,29	Fenilacetaldhido	1044	1045
12	7,84	Hidrato de <i>cis</i> -sabineno	1069	1073
13	8,32	C ₁₀ H ₁₂ : 65(22), 91(48), 109(18), 115(60), 117(100), 124(16), 131(19)*	1091	---
14	8,72	Acetato de octen-1-ilo	1109	1107
15	8,83	2-Feniletanol	1114	1118
16	8,92	4,7,7-Trimetilbicio[3.3.0]octan-2-ona	1118	1064
17	10,10	α -Terpineol	1170	1144

Tabla 4.3 (cont.)

Pico N°.	t_R (min)	Identificación	I^T exp.	I^T bibliografía **
18	10,12	<i>endo</i> -Borneol	1171	1173
19	10,48	<i>p</i> -Cimen-8-ol	1187	1186
20	10,57	1-Dodeceno	1191	1191
21	10,67	1,2-Bencenodiol	1195	1197
22	11,21	4,7-Dimetilbenzofurano	1219	1220
23	11,26	C ₁₀ H ₁₂ O: 51(17), 77(28), 79(13), 91(20), 105(89), 133(58), 148(100)*	1221	---
24	12,48	Isopiperitenona	1274	1272
25	13,39	2-Hidroxi-5-metilacetofenona	1317	1316
26	14,05	Piperitenona	1347	1344
27	14,18	2,6-Dimetoxifenol	1353	1357
28	14,62	Óxido de piperitenona	1373	1375
29	14,90	C ₁₀ H ₁₄ O: 41(49), 69(91), 82(100), 150(70), 179(4), 194(7)*	1386	---
30	15,09	β -Bourboneno	1394	1384
31	15,26	<i>cis</i> -Jasmona	1402	1400
32	15,36	C ₁₀ H ₁₄ O ₂ : 105(31), 123(82), 137(25), 151(22), 166(100)*	1407	---
33	15,84	<i>trans</i> -Cariofileno	1431	1437
34	16,01	No identificado : 57(14), 77(10), 89(30), 136(100)*	1439	---
35	16,42	α -Humuleno	1458	1454
36	16,55	β -Farneseno	1465	1458

Tabla 4.3 (cont.)

Pico N°.	t_R (min)	Identificación	I^T exp.	I^T bibliografía **
37	16,73	Biciclosesquifelandreno	1473	1467
38	16,91	No identificado: 43(100), 60(41), 95(50), 107(56), 122(21), 135(53), 150(66)*	1482	---
39	17,10	γ -Cadineno	1491	1513
40	18,14	No identificado : 43(52), 67(82), 95(100), 109(24), 113(26), 121(26), 126(20), 55(33)*	1543	---
41	19,63	No identificado : 43(14), 69(18), 91(8), 165(100), 180(8)*	1619	---
42	21,86	No identificado : 91(38), 119(21), 124(59), 137(100), 180(64)*	1740	---
43	23,60	Neofitadieno isómero I	1839	1836
44	24,03	Neofitadieno isómero II	1864	---
45	24,33	Neofitadieno isómero III	1882	---
46	25,60	Ácido hexadecanoico	1959	1957

* Fragmentos m/z característicos y sus abundancias entre paréntesis

** Adams, 2001; Lorenzo y col., 2002; Brada y col., 2006; Gulluce y col., 2007; Babushok y Zenkevich, 2009; Riahi y col., 2013.

Las familias de compuestos más abundantes encontradas fueron **monoterpenos** (α -pineno, β -pineno, β -mirceno, limoneno, etc.), **monoterpenos oxigenados** (1,8-cineol, hidrato de *cis*-sabineno, α -terpineol, isopiperitenona, piperitenona, óxido de piperitenona, etc.), y **sesquiterpenos** (β -bourboneno, *trans*-cariofileno, β -farneseno, etc.), seguidas de **alcoholes** como 3-heptanol, 2-heptanol, 1-octen-3-ol, 3-octanol, 2-feniletanol, entre otros. Se detectaron también un menor número de compuestos de otras familias como ácidos grasos, alcanos, etc. La presencia de la mayoría de estos compuestos ha sido previamente descrita en aceites esenciales de *M. rotundifolia* (Lorenzo y col., 2002; Brada y col., 2006; Riahi y col., 2013) y de otras especies de menta (Thach y col., 2013;

Kimbaris y col., 2017). Sin embargo, merece la pena destacar que varios isómeros del neofitadieno ($I^T = 1839, 1864$ y 1882) fueron tentativamente identificados por primera vez en los extractos MAE de *M. rotundifolia* aquí descritos.

Una vez estudiados los terpenoides presentes en los extractos etanólicos de hojas de *M. rotundifolia*, se procedió a seleccionar la técnica de extracción más adecuada en cuanto a un mayor rendimiento en la extracción de estos compuestos bioactivos. De acuerdo a los antecedentes bibliográficos descritos previamente (Sección 4.1.3), se seleccionaron como técnicas a comparar SLE, UAE y MAE.

La selección de la técnica óptima de extracción debe estar basada fundamentalmente en el rendimiento de extracción de los compuestos bioactivos de interés, pero adicionalmente, deben tenerse en cuenta las ventajas en cuanto a reproducibilidad y simplicidad de operación de la técnica. Para llevar a cabo este estudio se escogió la muestra MR14 y, de los compuestos identificados, se seleccionaron el óxido de piperitenona, piperitenona, isopiperitenona, 1,8-cineol, hidrato de *cis*-sabineno y *trans*-cariofileno como los terpenoides más característicos de la *M. rotundifolia*. Los extractos se obtuvieron mediante SLE y MAE a 30 °C (SLE30 y MAE30) y a 60 °C (SLE60 y MAE60) y haciendo uso de un baño de UAE a temperatura inferior a 26 °C, en todos los casos durante 30 min, según se indica en la sección 4.2.3.2.1 de esta Memoria.

La comparación de las concentraciones extraídas de los seis compuestos bioactivos objeto de estudio a partir de la muestra MR14 (**Tabla 4.4**), puso de manifiesto que no existían diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las concentraciones de los extractos MAE30 y SLE30, excepto para el óxido de piperitenona que fue extraído más eficazmente en MAE30 y el *trans*-cariofileno que presentó mayores concentraciones en SLE30. Por su parte, las concentraciones de piperitenona y *trans*-cariofileno no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos por UAE y MAE30. Sin embargo, MAE30 extrajo un contenido superior ($p < 0.05$) de óxido de piperitenona y UAE extrajo una mayor cantidad del resto de los compuestos. En general, UAE fue también más eficaz que la SLE30 para la extracción de terpenoides bioactivos, excepto para la piperitenona para la que no hubo diferencias significativas entre ambas técnicas y para el *trans*-cariofileno que presentó concentraciones más elevadas por SLE30.

Tabla 4.4. Rendimientos de extracción (mg g⁻¹ peso seco) obtenidos para los terpenoides bioactivos característicos de hojas de *M. rotundifolia* (MR14) mediante extracción asistida por microondas (MAE), extracción sólido-líquido (SLE) a 30 °C y 60 °C y mediante extracción asistida por ultrasonidos (UAE).

COMPUESTO	MAE30		SLE30		UAE		MAE60		SLE60	
	Rendimiento	RSD* (%)	Rendimiento	RSD (%)	Rendimiento	RSD (%)	Rendimiento	RSD (%)	Rendimiento	RSD (%)
1,8-cineol	0,024 ^a	1,9	0,022 ^a	28,1	0,035 ^b	3,2	0,036 ^b	2,8	0,039 ^b	3,2
hidrato de <i>cis</i>-sabineno	0,010 ^a	1,2	0,009 ^a	16,9	0,015 ^c	13,6	0,011 ^{a,b}	3,5	0,014 ^{b,c}	5,2
Isopiperitenona	0,001 ^a	1,7	0,001 ^a	7,5	0,003 ^b	7,7	0,004 ^c	4,3	0,005 ^c	0,5
Piperitenona	0,094 ^a	3,0	0,079 ^a	17,0	0,086 ^a	6,6	0,120 ^b	2,3	0,115 ^b	3,6
óxido de piperitenona	0,678 ^b	1,4	0,598 ^a	12,0	0,595 ^a	3,9	0,751 ^b	0,6	0,826 ^c	6,3
<i>trans</i>-cariofileno	0,014 ^a	0,6	0,022 ^b	14,7	0,015 ^a	7,5	0,032 ^c	3,2	0,037 ^d	3,8

* RSD ($n = 3$)

^{a-c} Distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) para cada compuesto entre las distintas técnicas y condiciones.

Teniendo en cuenta que el baño de UAE no permitía subir la temperatura por encima de los 30 °C de forma controlada, se evaluó el efecto de la temperatura de extracción de los terpenoides bioactivos de *M. rotundifolia* únicamente mediante SLE y MAE. Como era de esperar, las extracciones llevadas a cabo a 60 °C por ambas técnicas proporcionaron rendimientos de extracción significativamente ($p < 0,05$) superiores a los obtenidos a 30 °C, independientemente del compuesto considerado. Un comportamiento similar se observó al comparar los métodos SLE y MAE a 60 °C con UAE para la mayor parte de los compuestos, excepto para el 1,8-cineol y el hidrato de *cis*-sabineno, cuyos rendimientos de extracción fueron, en general, similares para todas las técnicas. Comparando MAE60 y SLE60, no se encontraron diferencias significativas en los rendimientos de extracción para la mayoría de los compuestos extraídos por ambas técnicas, excepto para el óxido de piperitenona (0,826 mg g⁻¹ de muestra seca) y el *trans*-cariofileno (0,037 mg g⁻¹ de muestra seca) para los que se obtuvieron rendimientos ligeramente superiores con SLE60.

En cuanto a la reproducibilidad de los datos e independientemente de la temperatura considerada, MAE resultó ser la técnica más reproducible para la extracción de terpenoides bioactivos, con valores de desviación estándar relativa (RSD) por debajo del 4,3%. Por lo tanto, considerando como criterio principal de selección un compromiso entre el rendimiento de extracción y la reproducibilidad, se seleccionó la técnica MAE para posteriores estudios. Estos resultados están en consonancia con los descritos por Dai y col., (2010), quienes propusieron la MAE como la mejor técnica de extracción (en comparación con SLE, extracción a reflujo y UAE), por su rapidez y su alta recuperación de terpenoides de la familia del *p*-mentano a partir de hojas de *Mentha piperita* L.

4.3.2.2. Selección de condiciones óptimas para la obtención de extractos etanólicos multifuncionales por MAE

Tras los ensayos preliminares descritos en la sección 4.3.2.1. se llevó a cabo una optimización completa del método MAE ya que, como se ha comentado previamente, la extracción de compuestos bioactivos de plantas depende de diversos parámetros experimentales como la temperatura (T) y el tiempo de extracción (t), la relación s/V , etc. (Sparr y Bjöklund, 2000; Wang y Weller, 2006).

Aunque se ha descrito que temperaturas elevadas mejoran el rendimiento de extracción de algunos compuestos bioactivos, dichas temperaturas pueden dar lugar también a la degradación de compuestos termolábiles de la menta (Dai y col., 2010). Por ello, y con el fin de seleccionar el rango de temperaturas a considerar en la optimización del método MAE, se llevaron a cabo experimentos a un tiempo de extracción ($t = 30$ min) y con una cantidad de muestra ($s = 1,5$ g) fijos, empleando temperaturas en el rango de 100-180 °C.

Temperaturas por encima de 100 °C dieron lugar a una disminución en las concentraciones de los terpenoides bioactivos mayoritarios (82% y 99% de pérdida de piperitenona y óxido de piperitenona a 180 °C, respectivamente). Además, en los cromatogramas de GC-MS correspondientes a las extracciones llevadas a cabo a temperaturas ≥ 100 °C, se detectaron tres nuevos compuestos (picos 23, 29 y 32 (**Tabla 4.3**)) cuyas concentraciones aumentaron con la temperatura de extracción por MAE. Por tanto, es posible que dichos compuestos sean productos de degradación de los terpenoides de la menta. Para confirmar esta hipótesis se procedió en primer lugar a su caracterización mediante los iones característicos de sus espectros de masas y sus datos de retención (ver **Tabla 4.3**). El pico 23 presentó un tiempo de retención de 11,26 min y un espectro de masas con el pico base a m/z 148. Otros fragmentos de MS característicos fueron m/z 105, 133 y 91, pudiéndose asignar este pico cromatográfico a un compuesto de fórmula empírica $C_{10}H_{12}O$. De forma similar, el pico 29 presentó un tiempo de retención de 14,90 min y unos fragmentos característicos a m/z 82, 150 y 194, concordantes con un compuesto de fórmula $C_{10}H_{14}O$. Por su parte el pico 32, con tiempo de retención de 15,36 min, se asignó a un compuesto con fórmula empírica $C_{10}H_{14}O_2$ por sus fragmentos característicos de m/z 166, 151 y 123.

Con objeto de determinar si los compuestos detectados procedían de la degradación de los terpenoides mayoritarios de los extractos de menta, se prepararon a continuación unas disoluciones etanólicas de piperitenona y óxido de piperitenona que se sometieron a un calentamiento a temperaturas superiores a 100 °C. Sin embargo, en estos estudios no se observó la formación de dichos compuestos, no pudiéndose determinar su origen, ni identificar inequívocamente su estructura química. Es posible que la degradación de otros compuestos presentes en los extractos de *M. rotundifolia*, como por ejemplo los compuestos fenólicos pudieran ser los precursores de estos compuestos volátiles (Vergara-Salinas y col., 2012).

Finalmente, como la composición de los extractos se vió afectada al aumentar la temperatura por encima de 100 °C, se seleccionó para la optimización del método MAE un intervalo de temperaturas a evaluar comprendido entre 50 y 100 °C.

En cuanto al tiempo, se eligieron 30 min como tiempo máximo ya que estudios previos habían descrito que tiempos superiores en la extracción por MAE daban lugar a la degradación de derivados del *p*-mentano como la mentona y el mentol (Dai y col., 2010). Además, uno de los principales propósitos del presente estudio era desarrollar un método MAE rápido para la extracción de compuestos bioactivos de *M. rotundifolia*.

Respecto al volumen de disolvente de extracción, se eligieron 10 mL (volumen mínimo admitido en los vasos X-Press 1500, CEM) con objeto de minimizar la cantidad de disolvente, teniendo en cuenta el desarrollo de un método limpio con el medio ambiente y de un proceso miniaturizado para que el posterior proceso de secado del extracto, que es la forma más estable para su almacenamiento, fuese lo más corto y sencillo posible. Como se ha comentado anteriormente, el disolvente elegido fue el etanol, por extraer mayores cantidades de piperitenona y óxido de piperitenona (sección 4.3.1), dos de los terpenoides bioactivos mayoritarios presentes en *Mentha rotundifolia* (Lorenzo y col., 2002; Rihahi y col., 2013), además de por tratarse de un disolvente limpio y un buen extractante de compuestos bioactivos (antimicrobianos, antioxidantes, etc) de *Mentha* sp. (Dai y col., 2010; Moldovan y col., 2014).

En cuanto a la relación s/V , se seleccionó un intervalo de 0,75-1,5 g de muestra /10 mL de etanol con fin de alcanzar un compromiso entre la obtención de extractos enriquecidos en los compuestos de interés y de miniaturizar la cantidad de muestra empleada.

La influencia de los tres factores MAE en estudio (T , t y s ; considerando fijo V) en la extracción de los compuestos bioactivos individuales (R_x) y en la cantidad total de compuestos volátiles seleccionados (R_t) fue evaluada aplicando una metodología de superficie de respuesta. La **Tabla 4.5** muestra la concentración (datos en mg g⁻¹ de muestra seca) de R_t y de R_x determinada por GC-MS para los extractos MAE obtenidos en las distintas condiciones ensayadas. R_t varió entre 0,66 y 1,31 mg g⁻¹ de muestra seca. El óxido de piperitenona (0,5-1,1 mg g⁻¹ de muestra seca) fue el compuesto bioactivo más abundante seguido por la piperitenona (0,08-0,16 mg g⁻¹ de muestra seca). Otros compuestos bioactivos como el 1,8-cineol (0,018-0,064 mg g⁻¹ de muestra seca), hidrato

de *cis*-sabineno (0,009-0,015 mg g⁻¹ de muestra seca), y *trans*-cariofileno (0,024-0,045 mg g⁻¹ de muestra seca) fueron también detectados en cantidades significativas.

La metodología de superficie de respuesta se empleó para calcular los coeficientes de los modelos propuestos y para estimar la significación estadística de los coeficientes de regresión. Temperaturas altas (100 °C) permitieron maximizar R_t , proporcionando la máxima cantidad de compuestos volátiles con excepción del 1,8-cineol, para el que se extrajeron mayores concentraciones a 75°C. Mientras T resultó ser la única variable significativa ($p < 0.05-0.10$) afectando a R_t y a la mayoría de las respuestas individuales (R_x), el modelo para la estimación de la concentración del 1,8-cineol y el óxido de piperitenona incluyó variables adicionales. Así, en el caso del 1,8-cineol, T^2 , $t \cdot s$ y s resultaron ser variables significativas ($p < 0,05$), siendo las condiciones óptimas experimentales 75 °C, 30 min y 0,75 g de muestra seca ($R_{1,8-cineol} = -0,097 + 0,0032 \cdot T + 0,0022 \cdot t + 0,019 \cdot s - 0,00002 \cdot T^2 - 0,002 \cdot t \cdot s$). Sin embargo, el óxido de piperitenona se extrajo con mayores rendimientos cuando se utilizaron altas temperaturas y tiempos de extracción intermedios (condiciones óptimas: 100 °C, 17,5 min, 0,75 g muestra seca) ($R_{\text{óxido de piperitenona}} = 0,83 + 0,004 \cdot T - 0,26 \cdot s$).

La actividad antioxidante (ensayo DPPH·) y el contenido en compuestos fenólicos totales (TPC) de los diferentes extractos también se tuvo en cuenta para la optimización del procedimiento MAE (**Tabla 4.5**). Respecto al modelo R_{DPPH} , los coeficientes más significativos ($p < 0.05$) fueron T , s , $T \cdot s$ y t ($R_{DPPH} = 2,19 - 0,02 \cdot T + 0,02 \cdot t - 3,24 \cdot s + 0,06 \cdot T \cdot s$), mientras que T , s y t lo fueron para el modelo R_{TPC} ($R_{TPC} = -1,11 + 0,02 \cdot T + 0,01 \cdot t + 0,70 \cdot s$). Como lo demuestran sus valores de R^2 (94,2% y 97,3%, respectivamente) y la desviación estándar de los residuos obtenidos (0,29 y 0,07, respectivamente), los modelos propuestos describieron con precisión la variabilidad de ambas respuestas. Además, el conjunto óptimo de condiciones de operación (100 °C, 30 min, 1,5 g de muestra seca) que maximiza la bioactividad y el TPC fue igual, excepto por la cantidad de muestra, a las condiciones que dan lugar al rendimiento máximo de terpenoides bioactivos totales (R_t). Teniendo en cuenta estos resultados y que la bioactividad de los extractos de plantas es el resultado del efecto sinérgico entre los distintos compuestos (Burt, 2004), se consideró una respuesta múltiple que maximizó simultáneamente R_t , R_{DPPH} y R_{TPC} , obteniéndose como condiciones óptimas para la obtención de extractos multifuncionales 100°C, 24 min y 1,5 g de muestra seca ($R_D = 0,94$).

Se evaluó también el número de ciclos de extracción en términos de rendimiento de extracción (datos en mg g⁻¹ de muestra seca) para las condiciones previamente optimizadas. Dada la similitud estructural, el rendimiento de extracción para la mayoría de los compuestos bioactivos fue bastante similar independientemente del ciclo considerado. La isopiperitenona fue el único compuesto que se recuperó completamente con un único ciclo de extracción, mientras se necesitaron dos ciclos para proporcionar entre el 93-96% del resto de los terpenoides. Debido a la dilución asociada con la mezcla de los distintos ciclos de extracción (C1 y C2) y al mayor tiempo requerido para el posterior secado de los extractos previo a su almacenamiento, se consideró un único ciclo de extracción para la obtención de extractos de *M. rotundifolia* con un contenido suficientemente alto (61-72% de la cantidad total extraída) de los terpenoides de interés.

Tabla 4.5. Resultados obtenidos en el diseño de experimentos Box-Behnken llevado a cabo para la optimización de la MAE de terpenoides bioactivos de *M. rotundifolia*.

<i>T</i> (°C)	<i>t</i> (min)	<i>s</i> (g)	<i>R_t</i> (mg g ⁻¹ de muestra seca)	<i>R_x</i> (mg g ⁻¹ de muestra seca)						<i>R_{TFC}</i> (mg GAE mL ⁻¹)	<i>R_{DPPH}</i> (mg Trolox mL ⁻¹)
				1,8-Cineol	Hidrato de <i>cis</i> -sabineno	Isopiperitenona	Piperitenona	Óxido de piperitenona	<i>trans</i> -Cariofileno		
75	17,5	1,125	1,1 (0,2)*	0,036 (0,004)	0,0115 (0,0008)	0,0054 (0,0005)	0,121 (0,008)	0,89 (0,05)	0,035 (0,003)	1,20 (0,04)	2,42 (0,17)
75	17,5	1,125	1,3 (0,1)	0,047 (0,006)	0,0133 (0,0008)	0,0066 (0,0007)	0,14 (0,01)	1,01 (0,04)	0,045 (0,003)	1,23 (0,04)	2,27 (0,11)
75	30,0	1,500	1,11 (0,05)	0,033 (0,005)	0,0113 (0,0009)	0,0055 (0,0004)	0,122 (0,008)	0,90 (0,05)	0,033 (0,003)	1,61 (0,06)	2,63 (0,11)
100	17,5	0,750	1,19 (0,04)	0,042 (0,002)	0,0151 (0,0001)	0,0074 (0,0004)	0,16 (0,01)	0,92 (0,04)	0,045 (0,002)	1,37 (0,06)	2,267 (0,004)
75	5,0	1,500	0,97 (0,07)	0,0413 (0,0009)	0,0119 (0,0002)	0,0055 (0,0002)	0,127 (0,002)	0,74 (0,07)	0,0392 (0,0009)	1,32 (0,03)	2,33 (0,09)
50	30,0	1,125	0,9 (0,1)	0,027 (0,004)	0,011 (0,001)	0,0048(0,0003)	0,12 (0,01)	0,67 (0,08)	0,033 (0,003)	0,81 (0,04)	1,31 (0,14)
50	17,5	1,500	0,66 (0,06)	0,0178 (0,0008)	0,0091 (0,0007)	0,0036 (0,0005)	0,101 (0,003)	0,50 (0,05)	0,024 (0,002)	0,9 (0,1)	1,24 (0,19)

Tabla 4.5 (cont.)

<i>T</i> (°C)	<i>t</i> (min)	<i>s</i> (g)	<i>R_t</i> (mg g ⁻¹ de muestra seca)	<i>R_x</i> (mg g ⁻¹ de muestra seca)						<i>R_{TPC}</i> (mg GAE mL ⁻¹)	<i>R_{DPPH}</i> (mg Trolox mL ⁻¹)
				1,8-cineol	hidrato de <i>cis</i> -sabineno	isopiperitenona	piperitenona	óxido de piperitenona	<i>trans</i> -cariofileno		
50	5,0	1,125	0,9 (0,1)	0,026 (0,003)	0,010 (0,001)	0,0040 (0,0004)	0,109 (0,005)	0,8 (0,1)	0,028 (0,002)	0,59 (0,02)	1,26 (0,08)
100	17,5	1,500	1,02 (0,03)	0,0321 (0,0005)	0,0104 (0,0001)	0,0050 (0,0001)	0,123 (0,006)	0,81 (0,02)	0,036 (0,002)	1,96 (0,08)	4,43 (0,08)
100	5,0	1,125	1,2 (0,1)	0,0347 (0,0008)	0,0115 (0,0004)	0,0057 (0,0002)	0,143 (0,004)	1,02 (0,06)	0,040 (0,002)	1,38 (0,04)	3,22 (0,25)
50	17,5	0,750	1,3 (0,2)	0,030 (0,003)	0,011 (0,001)	0,0044 (0,0004)	0,113 (0,003)	1,1 (0,1)	0,034 (0,004)	0,59 (0,02)	1,22 (0,17)
100	30,0	1,125	1,31 (0,09)	0,038 (0,003)	0,0108 (0,0002)	0,006 (0,001)	0,126 (0,007)	1,09 (0,01)	0,038 (0,002)	1,71 (0,07)	4,16 (0,21)
75	30,0	0,750	1,10 (0,03)	0,064 (0,002)	0,0123 (0,0007)	0,0037 (0,0001)	0,087 (0,006)	0,89 (0,03)	0,043 (0,002)	0,95 (0,02)	2,57 (0,10)
75	17,5	1,125	0,93 (0,03)	0,054 (0,004)	0,010 (0,001)	0,0031 (0,0001)	0,083 (0,002)	0,74 (0,02)	0,036 (0,003)	1,18 (0,03)	2,56 (0,22)
75	5,0	0,750	1,1 (0,2)	0,035 (0,001)	0,011 (0,001)	0,004 (0,001)	0,14 (0,02)	0,8 (0,1)	0,037 (0,005)	0,79 (0,03)	1,44 (0,07)

*Valor medio (*n* = 3) y desviación estándar entre paréntesis

4.3.2.3. Evaluación de diferentes procesos de enriquecimiento en terpenoides de los extractos obtenidos por MAE

Para obtener extractos de *M. rotundifolia* enriquecidos en terpenoides bioactivos, debe tenerse en cuenta que en las extracciones de estos compuestos se coextraen también clorofilas y otros pigmentos que es necesario eliminar para enriquecer el extracto en los terpenoides bioactivos. Con este objetivo, se evaluaron dos estrategias: el tratamiento con carbón activo (AC) y el tratamiento con SPE (C₁₈). La evaluación de cada técnica se realizó considerando la menor pérdida de los compuestos volátiles seleccionados y el enriquecimiento obtenido al usar estos procedimientos de limpieza. La **Tabla 4.6** muestra los resultados obtenidos. El enriquecimiento en compuestos bioactivos fue mayor mediante SPE (> 76%) que por AC (53-76%). Sin embargo, el uso del SPE supuso una pérdida de hasta el 43% de dichos compuestos bioactivos, mientras que con el uso del AC las pérdidas fueron bastante menores (entre el 2-13%). En base a estos resultados, se escogió el procedimiento del carbon activo como la técnica más apropiada para la eliminación de interferentes de los extractos de *M. rotundifolia*, conservando su contenido en terpenoides bioactivos. Sin embargo, y con respecto a la actividad antioxidante, los extractos sometidos a tratamiento con AC mostraron una bioactividad notablemente baja (los valores de mg GAE mL⁻¹ se redujeron a la mitad comparados con los extractos no purificados).

Por lo tanto, el uso de AC como un procedimiento de limpieza debe reservarse para aquellas aplicaciones en las que se desean extractos con alta pureza en terpenoides sobre extractos con mayor actividad antioxidante. En el presente estudio, y teniendo en cuenta la aplicabilidad prevista de los extractos de *M. rotundifolia* como ingredientes alimentarios funcionales / conservantes de alimentos, se emplearon los extractos MAE no tratados en los siguientes estudios.

Tabla 4.6. Datos porcentuales referidos a la composición original del extracto de *Mentha rotundifolia* (obtenido bajo las condiciones: 100 °C, 24 min, 1,5 g/10 mL de etanol, 1 ciclo) tras el tratamiento con carbon activo (AC) o la extracción en fase sólida (SPE) como procedimientos de limpieza.

Compuesto	Pérdida de los volátiles seleccionados (%)		Enriquecimiento (%)	
	AC	SPE	AC	SPE
1,8-cineol	8 (5)*	43 (3)	62 (9)	76 (9)
hidrato de <i>cis</i> -sabineno	13 (4)	42 (6)	53 (8)	80 (17)
isopiperitenona	2 (1)	39 (5)	76 (31)	88 (16)
piperitenona	10 (6)	38 (6)	59 (10)	92 (19)
óxido de piperitenona	9 (5)	34 (8)	61 (9)	105 (23)
<i>trans</i> -cariofileno	3 (1)	4 (1)	72 (9)	211 (14)

*Valor medio ($n = 3$) y desviación estándar entre paréntesis

4.3.2.4. Aplicación del método MAE optimizado a muestras de *M. rotundifolia* de distintos años de recogida

Las condiciones de operación previamente seleccionadas como óptimas para la extracción por MAE de compuestos bioactivos de *M. rotundifolia* (**100°C, 24 min, 1,5 g/10 mL de etanol, 1 ciclo**) fueron aplicadas a muestras de esta especie de menta recogidas en distintos años (**Tabla 4.7**).

Según las referencias previas sobre los aceites esenciales de muestras de *M. rotundifolia* recogidas en todo el mundo (Lorenzo y col., 2002; Brada y col., 2006), las muestras españolas aquí extraídas (MR14 y MR15) pertenecen a un quimiotipo rico en óxido de piperitenona, un terpenoide con actividades antioxidante, antibacteriana y antifúngica, entre otras (Brada y col., 2006; Božović y col., 2015; Santana-Méridas y col., 2017).

Se observaron diferencias significativas tanto en los rendimientos de extracción (datos en mg g⁻¹ de muestra seca) como en la selectividad de la extracción (datos en mg g⁻¹ de extracto seco) para los extractos correspondientes a las dos muestras objeto de

estudio. La piperitenona y el óxido de piperitenona se extrajeron en una proporción 1:5 en MR14 (0,2 y 0,9 mg g⁻¹ de muestra seca, respectivamente), mientras que MR15 mostró contenidos similares de ambos compuestos (1,1 y 1,6 mg g⁻¹ de muestra seca, respectivamente) y no se detectó 1,8-cineol en ésta última muestra. MR15 mostró una concentración cuatro veces superior a MR14 en hidrato de *cis*-sabineno, mientras que no se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en los niveles de isopiperitenona y *trans*-cariofileno entre ambas muestras.

En cuanto al enriquecimiento logrado para los extractos MAE, se observaron diferencias significativas entre MR14 y MR15. Ésta última muestra de *M. rotundifolia* proporcionó extractos más ricos en piperitenona y óxido de piperitenona.

La localización de la planta y el año de cosecha, entre otros factores, ejercen un efecto en la composición y, por lo tanto, en la bioactividad de los extractos de plantas según la bibliografía (Brada y col., 2006; Ekka y col., 2008; Riahi y col., 2013). En este sentido, las distintas condiciones climatológicas de los años de recolecta de las muestras MR14 y MR15 pueden justificar esta variabilidad en su composición en cuanto a terpenoides bioactivos se refiere.

Con respecto al TPC, la muestra MR14 mostró contenidos mayores que la MR15, observándose también una mayor actividad antioxidante para esta muestra (con un valor de IC₅₀ más bajo) (**Tabla 4.7**). Como es sabido, la actividad antioxidante total de un extracto es el resultado de la contribución de diferentes clases de compuestos químicos y, por lo tanto, en el presente estudio, las diferencias en la concentración de compuestos fenólicos de ambos extractos, junto con el diferente contenido de terpenoides, podrían justificar los resultados obtenidos.

Como se ha descrito en la bibliografía (Stagos y col., 2012), los aceites esenciales y los extractos de la mayoría de las plantas de la familia de las Lamiaceae (e.g. *Mentha*, *Salvia*, *Sideritis*, etc) poseen una elevada actividad antioxidante. Sin embargo, mientras son numerosas las publicaciones que tratan la actividad antioxidante de los aceites esenciales de las distintas especies de menta (Gulluce y col., 2007; Riahi y col., 2013; Singh y col., 2015), son muchos menos los estudios que evalúan la bioactividad de extractos, la mayoría de los cuales han sido obtenidos mediante extracción convencional (Gulluce y col., 2007; Moldovan y col., 2014). Además, los diferentes ensayos (DPPH, ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno), FRAP (poder antioxidante

reductor del hierro), etc) y patrones de referencia empleados (Trolox, BHT, etc.) también dificultan la comparación de experimentos con los datos publicados en la bibliografía.

En un estudio realizado por Moldovan y col. (2014), los valores de IC₅₀ para extractos etanólicos al 70% de *M. rotundifolia* (IC₅₀ = 104,74 µg mL⁻¹) y de otras cuatro especies de menta cultivadas en Rumanía (IC₅₀ = 109,86-284,61 µg mL⁻¹) fueron 10-20 veces más altos que el IC₅₀ del Trolox. De manera similar, Brahmi y col. (2015), encontraron valores de IC₅₀ en un rango entre 4 y 16 veces más alto que el del antioxidante Trolox para extractos etanólicos obtenidos por extracción convencional (temperatura ambiente, 24 h) de *M. spicata*, *M. pulegium* y *M. rotundifolia* de muestras recogidas en Argelia. Sin embargo, los valores de IC₅₀ determinados para los extractos en estudio (**Tabla 4.7**) mostraron una actividad antioxidante sólo de 2 a 4 veces más baja que el compuesto de referencia (IC₅₀ Trolox = 33,39 µg mL⁻¹). Esto podría ser debido a la mayor eficacia de extracción de MAE en comparación con las técnicas convencionales.

En cuanto al TPC, en comparación con los datos publicados, los extractos de MAE aquí obtenidos mostraron un contenido similar a los de diferentes especies de menta de Argelia obtenidos por extracción etanólica convencional (4,6-12,0 mg de GAE g⁻¹ de muestra seca) (Brahmi y col., 2015). Sin embargo, los valores de TPC que se muestran en la **Tabla 4.7** fueron menores que los encontrados para un extracto metanólico obtenido por Soxhlet a partir de una muestra turca de *M. longifolia* (45 mg de GAE g⁻¹ de planta seca; Gulluce y col., 2007) y para extractos etanólicos al 70% de diferentes especies de menta de Rumania (51-98 mg de GAE g⁻¹ planta seca; Moldovan y col., 2014). En este último caso, las diversas ubicaciones del cultivo y las diferentes condiciones experimentales (por ejemplo, disolvente de extracción) utilizadas, tanto para la extracción como para los ensayos de bioactividad *in vitro*, podrían justificar esta discrepancia en los resultados. Por lo tanto, deben llevarse a cabo estudios adicionales empleando un mayor número de muestras con el fin de identificar una posible correlación significativa entre el TPC y la actividad antioxidante de los extractos de MAE.

En conclusion, se ha optimizado un nuevo método MAE mediante el uso de un diseño de experimentos, que maximiza simultáneamente la obtención de terpenoides bioactivos y compuestos fenólicos totales de hojas de *M. rotundifolia*, así como su actividad antioxidante. Las ventajas de este método en cuanto a rapidez, eficacia y

Tabla 4.7. Contenido en terpenoides bioactivos de los extractos MAE (100 °C, 24 min, 1,5 g/10 mL de etanol, 1 ciclo) de dos muestras de hojas de *Mentha rotundifolia* recogidas en distintos años.

Compuesto / Actividad antioxidante	MR14		MR15	
	Rendimiento de extracción (mg g ⁻¹ muestra seca)	Selectividad de la extracción (mg g ⁻¹ extracto seco)	Rendimiento de extracción (mg g ⁻¹ muestra seca)	Selectividad de la extracción (mg g ⁻¹ extracto seco)
1,8-Cineol	0,05 (0,02)*	3 (1)	-	-
Hidrato de <i>cis</i> -sabineno	0,008 (0,004)	0,4 (0,2)	0,03 (0,01)	3,1 (0,4)
Isopiperitenona	0,007 (0,001) ^a	0,39 (0,04)	0,0073 (0,0003) ^a	0,68 (0,07)
Piperitenona	0,190 (0,004)	10,5 (0,2)	1,1 (0,1)	103 (4)
Óxido de piperitenona	0,9 (0,2)	51 (10)	1,6 (0,2)	148 (8)
<i>trans</i> -Cariofileno	0,046 (0,008) ^a	2,6 (0,5)	0,08 (0,02) ^a	7,5 (0,5)
IC ₅₀ (μg mL ⁻¹)	77,19 (1,03)		136,5 (17,5)	
TPC (mg GAE g ⁻¹ muestra seca)	19,6 (0,4)		12,0 (0,3)	

*Contenido medio y desviación estándar entre paréntesis ($n = 3$).^a Los datos para cada compuesto seguidos de la misma letra indican que no existen diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95%

reproducibilidad, pueden considerarse de interés para su potencial aplicación en la obtención de extractos de menta con la pretendida estandarización en cuanto a su composición.

4.3.3. Obtención de extractos acuosos multifuncionales a partir de hojas de menta

4.3.3.1. Selección de la técnica óptima

Para la selección de la técnica óptima se realizó un estudio biodirigido basado en la actividad antioxidante de distintos extractos de hojas de menta (MR14) obtenidos empleando tres técnicas de extracción avanzadas como son UAE, MAE y PLE. Para UAE se evaluó tanto el empleo de un baño de US como dos sondas con distinto diámetro interno (3 y 12 mm). Se trató que las condiciones de extracción fueran lo más similares posible para cada uno de los métodos empleados, usando temperaturas sobre 50 °C y tiempos cortos (5 min), tal y como se indica en la sección 4.2.3.2.1 de Materiales y Métodos.

La **Tabla 4.8** muestra los resultados obtenidos expresados en equivalentes de Trolox. Para los tratamientos por UAE, no se observaron diferencias significativas en la actividad antioxidante determinada para los extractos obtenidos mediante la sonda de 12 mm y el baño, sin embargo, la actividad fue significativamente menor en los extractos obtenidos haciendo uso de la sonda de 3 mm. El uso de la sonda de menor diámetro debería favorecer la ruptura de las paredes celulares de la muestra vegetal, permitiendo la penetración del disolvente en la matriz y facilitando la extracción de los compuestos con actividad antioxidante. Sin embargo, los resultados obtenidos mostraron un comportamiento contrario a este razonamiento, posiblemente debido a una degradación de los compuestos antioxidantes empleando la sonda de 3 mm que proporciona unas condiciones más enérgicas. Por otro lado, la actividad antioxidante de los extractos obtenidos con la sonda de UAE de 12 mm y el baño, fue significativamente menor que la de los extractos obtenidos mediante MAE y PLE, descartándose el UAE para los siguientes estudios. Al no existir diferencias significativas entre la actividad antioxidante de los extractos obtenidos por MAE y PLE, se seleccionaron ambas técnicas para los posteriores estudios, llevándose a cabo una optimización en profundidad de las condiciones de extracción en cada una de ellas.

Tabla 4.8. Actividad antioxidante determinada por el método de DPPH (expresada como equivalentes de Trolox (TE)) de los extractos acuosos obtenidos por UAE, MAE y PLE a partir de la muestra MR14.

Técnica	TE (mg mL ⁻¹)
Baño UAE	4,36 (0,46) ^{*b}
Sonda UAE 12 mm	4,66 (0,08) ^b
Sonda UAE 3 mm	2,62 (0,75) ^a
MAE	5,81 (0,20) ^c
PLE	5,42 (0,31) ^c

* Valor medio ($n = 3$) y desviación estándar entre paréntesis.

^{a-c} Distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) para cada compuesto entre las distintas técnicas y modalidades.

4.3.3.2. Optimización de la extracción asistida por microondas para la obtención de extractos acuosos multifuncionales

Al igual que para la extracción de terpenoides bioactivos, para el desarrollo de un método MAE para la obtención de extractos acuosos multifuncionales, se evaluó la temperatura, el tiempo de extracción, la relación cantidad de muestra/volumen de disolvente y el número de ciclos de extracción, que como ya se ha comentado son los parámetros fundamentales en el proceso de extracción (Soria y col., 2015; Ruiz-Aceituno y col., 2016).

En una primera etapa, y con el objetivo de seleccionar la relación s/V óptima, se llevaron a cabo experimentos a una temperatura y un tiempo de extracción fijos ($T = 75$ °C, $t = 30$ min), probándose distintos volúmenes de agua (10, 12 y 15 mL) con 1 g de *M. rotundifolia* (MR14). Dado que 10 mL no fueron suficientes para rehidratar la muestra y obtener un volumen de extractante suficiente, se consideraron 12 y 15 mL para los siguientes estudios. Para los extractos obtenidos con ambos volúmenes, no se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en la actividad antioxidante ($\mu\text{g mL}^{-1}$ de Trolox), seleccionándose 12 mL de agua al ser un volumen intermedio que garantizaba el mojado de la muestra, minimizando el volumen de disolvente extractante utilizado.

La optimización de la temperatura y el tiempo de extracción se llevó a cabo mediante un diseño de experimentos Box-Behnken, variando la temperatura de extracción entre 50 y 100 °C y el tiempo entre 5 y 30 min (**Tabla 4.9**). Los diferentes extractos acuosos de *M. rotundifolia* obtenidos en estas condiciones experimentales se evaluaron en cuanto a su contenido en compuestos fenólicos totales (R_{TPC}), su capacidad antioxidante (R_{DPPH}) y su actividad antimicrobiana frente *S. aureus* (R_{AA}).

Tabla 4.9. Diseño experimental y resultados obtenidos en la optimización del tiempo y temperatura de extracción por MAE de compuestos bioactivos de hojas de *Mentha rotundifolia* MR14.

Experimento	T (°C)	t (min)	R_{TPC} (mg GAE mL ⁻¹)	R_{DPPH} (mg TE mL ⁻¹)	R_{AA} (cm)
1	50	17,5	4,83 (0,09)*	7,9 (0,1)	-
2	50	5	5,12 (0,06)	6,1 (0,3)	-
3	50	30	4,5 (0,4)	6,8 (0,5)	-
4	75	5	5,45 (0,06)	8,9 (0,3)	1,2 (0,1)
5	75	30	5,48 (0,04)	7,3 (0,4)	1,1 (0,1)
6	100	30	5,80 (0,08)	7,1 (0,2)	1,4 (0,3)
7	75	17,5	5,2 (0,1)	7,1 (0,3)	1,7 (0,3)
8	100	17,5	5,58 (0,05)	8,4 (0,1)	1,7 (0,3)
9	100	5	5,5 (0,1)	8,7 (0,7)	1,6 (0,2)

* Valor medio ($n = 3$) y desviación estándar entre paréntesis.

La actividad antioxidante medida en términos de equivalentes de Trolox (TE) varió entre 6,1 y 8,9 mg mL⁻¹, y el contenido en compuestos fenólicos totales entre 4,5 y 5,8 mg GAE mL⁻¹. En general, los valores más altos de ambas respuestas se observaron a altas temperaturas (100 °C), mientras que a 50 °C los extractos obtenidos presentaron

bajas concentraciones de compuestos fenólicos totales, así como, baja actividad antioxidante.

En cuanto a la actividad antimicrobiana, los extractos obtenidos a bajas temperaturas (50 °C) no mostraron actividad, mientras que los extractos correspondientes a temperaturas de extracción de 75-100°C dieron lugar a unos halos de inhibición del crecimiento de *S. aureus* de entre 1,1 y 1,7 cm. En la **Figura 4.5** se muestra una fotografía tomada del ensayo de actividad frente a *S. aureus* de extractos de *Mentha rotundifolia* en agua obtenidos a 75 °C y 100 °C durante 17,5 min y a 100 °C durante 5 min, previa concentración (15 veces). Como se puede apreciar en la figura, los halos de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de los discos fueron similares en los tres casos.



Figura 4.5. Ensayo sobre la actividad del extracto MAE acuoso de MR14. En la fila superior de la placa y de izquierda a derecha se encuentran los extractos obtenidos a 75 °C, 17,5 min y a 100°C, 17,5 min. La fila inferior corresponde al experimento obtenido a 100°C, 5 min.

Para determinar el modelo matemático que mejor se ajustaba a los datos obtenidos, se llevó a cabo un estudio basado en una metodología de superficie de respuesta para R_{TPC} , R_{DPPH} y R_{AA} , calculando los coeficientes de los modelos cuadráticos propuestos y estimando el significado estadístico de los coeficientes de regresión.

En primer lugar, se evaluaron las condiciones que maximizaban de forma individual, cada una de las tres variables respuesta consideradas en este estudio. En general, extracciones a altas temperaturas (100 °C) maximizaron R_{DPPH} and R_{TPC} . En cuanto al tiempo de extracción, R_{TPC} presentó su valor óptimo (5,91 mg mL⁻¹ de GAE) para extracciones de 30 min, mientras que la máxima respuesta para R_{DPPH} (8,16 mg mL⁻¹ de TE) se obtuvo con extracciones de 5 min. Las variables T y $T \cdot t$ fueron las más significativas ($p < 0,05$) para R_{TPC} y la ecuación del modelo fue $R_{TPC} = 5,024 +$

$0,0033 \cdot T - 0,0552 \cdot t + 0,00074 \cdot T \cdot t$ ($R^2 = 91\%$). El análisis estadístico mostró que para R_{DPPH} , la única variable significativa fue T y la ecuación obtenida fue $R_{DPPH} = 5,889 + 0,0227 \cdot T$. Así, un incremento de la temperatura favorecería la obtención de extractos con una mayor capacidad antioxidante.

En cuanto a la actividad antimicrobiana (R_{AA}), altas temperaturas ($93 \text{ }^\circ\text{C}$) y tiempos de extracción intermedios (19 min) fueron las condiciones óptimas que generaron extractos MAE que maximizaban la inhibición del crecimiento de bacterias *S. aureus* ($R_{AA} = 1,61 \text{ cm}$). Los factores más significativos ($p < 0,05$) en esta optimización individual fueron T y T^2 , y el modelo de la ecuación fue $R_{AM} = -5,967 + 0,163 \cdot T - 0,00088 \cdot T^2$ ($R^2 = 94\%$).

Finalmente, se consideró una respuesta múltiple ($R_D = 0,78$) que **maximizara simultáneamente** las tres respuestas R_{DPPH} , R_{TPC} y R_{AA} , siendo **$100 \text{ }^\circ\text{C}$ y $14,7 \text{ min}$** las condiciones que daban lugar a los extractos multifuncionales óptimos de *M. rotundifolia* (**Figura 4.6**).

Una vez optimizados el tiempo y la temperatura de extracción, se evaluó el número de ciclos necesarios para la extracción exhaustiva de compuestos bioactivos con actividad antioxidante y antimicrobiana. En los extractos individuales de cada ciclo se determinó mediante HPLC-Q MS (sección 4.2.4.2) la concentración de una serie de compuestos fenólicos seleccionados (ácido salvianólico B, ácido rosmarínico, ácido siríngico, 7-*O*-glucósido de luteolina) descritos previamente en la bibliografía como los más abundantes en extractos de *M. rotundifolia* (Hossain y col., 2010; Brahmi y col., 2015; Taamalli y col., 2015). Mientras un único ciclo fue suficiente para extraer el 100% del ácido salvianólico B y entre el 74 y el 77% de los ácidos rosmarínico y siríngico, los porcentajes de 7-*O*-glucósido de luteolina extraídos en los ciclos C1 y C2 fueron similares (50% y 44%, respectivamente). En el tercer ciclo de extracción se extrajo una cantidad inferior al 7% de los compuestos fenólicos seleccionados. Considerando los resultados obtenidos, el mayor tiempo de procesado que suponen ciclos adicionales de extracción y la dilución asociada a la mezcla de extractos de diferentes ciclos, se eligió llevar a cabo un único ciclo de extracción MAE, en un compromiso por obtener una recuperación suficiente de los compuestos de interés, minimizando el tiempo de secado necesario para favorecer la conservación de estos extractos.

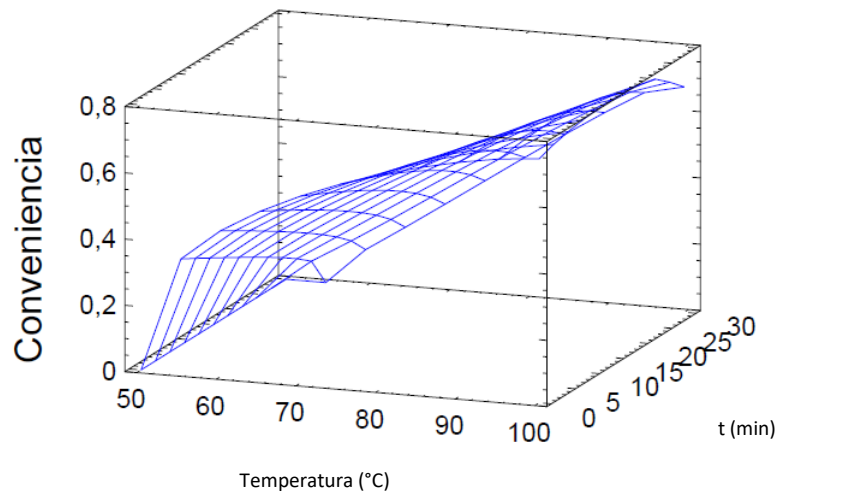


Figura 4.6. Superficie de respuesta en la optimización múltiple de la extracción MAE de *Mentha rotundifolia* en agua.

Por tanto, las condiciones óptimas para la obtención de extractos acuosos multifuncionales por MAE de hojas de *M. rotundifolia* fueron **100 °C, 14,7 min, 1 g de hojas de menta secas / 12 mL de agua y 1 ciclo de extracción.**

4.3.3.3. Optimización de la extracción con líquidos presurizados para la obtención de extractos acuosos multifuncionales

De forma similar al desarrollo de un método MAE para la obtención de extractos acuosos multifuncionales, se optimizaron los parámetros más influyentes en la extracción por PLE. Así, se evaluó la relación cantidad de muestra/volumen de disolvente, el tiempo y la temperatura de extracción, así como el número de ciclos. En este caso la muestra seleccionada para la optimización del proceso fue la MR15.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos anteriormente para la selección del disolvente de extracción (sección 4.3.1), el agua fue el disolvente empleado para los estudios por PLE. En primer lugar, se evaluó la relación s/V . Al contrario que en MAE, el volumen de disolvente no es un parámetro fijo en PLE, puesto que depende de la capacidad de la celda de extracción rellena con la muestra y con la arena de mar y de la cantidad de muestra empleada. Así, se llevó a cabo un estudio a 100 °C durante 18 min empleando distintas cantidades de muestra en la celda de extracción (0,5, 1 y 1,5 g de hojas de menta MR15), obteniéndose unas relaciones s/V de 0,04, 0,08 y 0,48 g mL⁻¹, respectivamente. Para evaluar el efecto de la relación s/V en la extracción de compuestos bioactivos, se seleccionaron cuatro de los compuestos descritos en *M. rotundifolia* en base a su abundancia y a su diferente naturaleza (Hossain y col., 2010; Brahmi y col., 2015; Taamalli y col., 2015). Así, se consideró el ácido siríngico, el 7-*O*-glucósido de luteolina, el ácido rosmarínico y el ácido salvianólico B. En la **Figura 4.7** se muestra el perfil cromatográfico por HPLC-Q MS de los compuestos seleccionados (fragmentos [M-H]⁻: 197, 447, 359 y 717, respectivamente) en modo SIM. Las concentraciones determinadas para estos compuestos en los extractos obtenidos se muestran en la **Tabla 4.10**. Como se puede observar, la extracción más eficaz fue la llevada a cabo empleando una relación s/V de 0,08 g mL⁻¹, dando así lugar a la recuperación de las mayores concentraciones de todos los compuestos de interés.

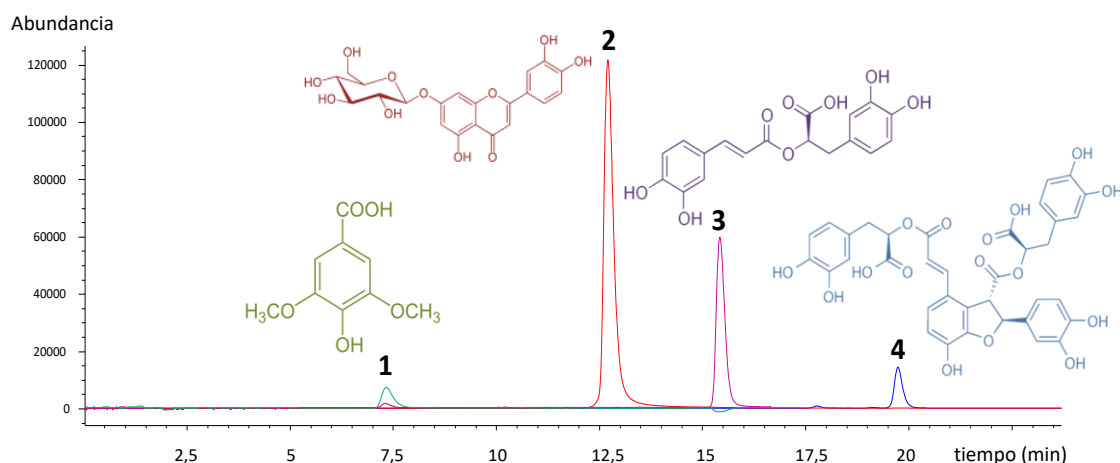


Figura 4.7. Perfil por HPLC-Q MS de los compuestos fenólicos seleccionados para la optimización de la relación cantidad de muestra/volumen de disolvente en la obtención de extractos acuosos multifuncionales por PLE. 1) Ácido siríntrico, 2) 7-*O*-glucósido de luteolina, 3) ácido rosmarínico, 4) ácido salvianólico B.

Tabla 4.10. Concentración ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ muestra seca) de los compuestos fenólicos seleccionados presentes en los extractos acuosos de *Mentha rotundifolia* obtenidos mediante PLE (100 °C, 18 min).

s/V	Concentración ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)			
	Ácido siríntrico	7- <i>O</i> -Glucosido de luteolina	Ácido rosmarínico	Ácido salvianólico B
0,04	2,1 (0,2)*	0,032 (0,003)	2,21 (0,06)	0,29 (0,03)
0,08	2,66 (0,09)	0,051 (0,005)	3,8 (0,2)	0,33 (0,02)
0,28	1,03 (0,09)	-	0,79 (0,06)	0,135 (0,004)

*Valor medio y desviación estándar entre paréntesis

La optimización de la temperatura y el tiempo de extracción por PLE se llevó a cabo mediante un diseño de experimentos Box-Behnken variando la temperatura de extracción entre 50 y 150 °C y el tiempo entre 5 y 30 min (**Tabla 4.11**). Se consideraron además de las variables respuesta relativas al contenido en compuestos fenólicos totales (R_{TPC}) y a la actividad antioxidante determinada por el método de los radicales DPPH (R_{DPPH}), ya consideradas en el desarrollo del método por MAE, la respuesta de la capacidad antioxidante determinada por el método ABTS (R_{ABTS}) y las concentraciones (mg g^{-1} de muestra seca) de los compuestos fenólicos seleccionados (ácido siríntrico, luteolín 7-*O*-glucósido, ácido rosmarínico y ácido salvianólico B) presentes en los

extractos PLE obtenidos en diferentes condiciones experimentales. Estos resultados se muestran en la **Tabla 4.11**.

De los compuestos fenólicos evaluados, en general, el mayoritario fue el ácido siríngico, encontrándose concentraciones de hasta 12,4 mg g⁻¹ de muestra seca (a 150 °C, 18 min), y en segundo lugar el ácido rosmarínico (1,78 mg g⁻¹ muestra seca a 100 °C y 18 min) seguido por el ácido salvianólico B (0,72 mg g⁻¹ muestra seca a 100 °C y 30 min). El compuesto extraído en menor cantidad fue el 7-*O*-glucósido de luteolina con una concentración máxima de 0,068 mg g⁻¹ muestra seca a 100 °C y 18 min. En cuanto al TPC, en general, los mayores contenidos se obtuvieron a temperaturas altas y tiempos intermedios (5,96 mg GAE mL⁻¹ a 150 °C, 18 min). Un comportamiento similar se observó para la medida de la actividad antioxidante, tanto por el método del DPPH, como por el ABTS (56,01 mM TE y 1300,5 µg mL⁻¹ TE a 150 °C y 18 min).

A continuación, se llevó a cabo un estudio basado en una metodología de superficie de respuesta para R_x , R_{TPC} , R_{DPPH} y R_{ABTS} para la determinación del modelo matemático que mejor se ajustara a los datos obtenidos. Para ello se calcularon los coeficientes de los modelos cuadráticos propuestos y se estimó el significado estadístico de los coeficientes de regresión. En primer lugar, se optó por analizar las condiciones que maximizaban individualmente cada una de las variables respuesta consideradas en el estudio. La **Tabla 4.12** muestra las ecuaciones de cada modelo y las condiciones óptimas para cada una de las respuestas consideradas. A modo de ejemplo, la **Figura 4.8**, muestra las superficies de respuesta obtenidas para maximizar la actividad antioxidante según el ensayo del DPPH, el TPC, y las concentraciones de ácido siríngico y 7-*O*-glucósido de luteolina. En general, las extracciones a altas temperaturas (por encima de 100 °C) maximizaron cada una de las respuestas, siendo T y T^2 las variables más significativas ($p < 0,05$) en todos los casos. Como se puede ver en la tabla, se observó una tendencia similar para la extracción del ácido rosmarínico, el ácido salvianólico B y el 7-*O*-glucósido de luteolina, para los que las condiciones óptimas de extracción fueron entre 98 °C y 109 °C y los tiempos óptimos entre 15 y 18 min. Sin embargo, la extracción del ácido siríngico se maximizó a temperaturas más elevadas y tiempos más largos, siendo necesario llevar a cabo las extracciones a 150 °C durante 30 min.

Tabla 4.11. Resultados del diseño experimental obtenidos en la optimización del tiempo y temperatura de extracción por PLE de compuestos bioactivos de hojas de *Mentha rotundifolia* MR15.

T (°C)	tiempo (min)	R_x (mg g ⁻¹ muestra seca)				R_{TPC} (mg GAE mL ⁻¹)	R_{ABTS} (mM TE)	R_{DPPH} (µg mL ⁻¹ TE)
		Ácido sinríngico	7-O-Glucósido de luteolina	Ácido rosmarínico	Ácido salvianólico B			
50	5	—	—	—	—	4,461	17,046	1190,8
50	18	—	0,006 (0,008)*	—	—	3,628	15,615	946,1
50	30	0,4 (0,1)	0,015 (0,04)	0,29 (0,07)	0,068 (0,009)	4,861	30,836	1156,0
100	5	1,7 (0,1)	0,04 (0,01)	2,26 (0,06)	0,35 (0,01)	5,719	51,950	1254,3
100	18	2,8 (0,6)	0,068 (0,009)	4,7 (0,1)	0,72 (0,02)	4,986	50,806	1293,5
100	18	2,66 (0,09)	0,051 (0,005)	3,8 (0,2)	0,33 (0,02)	5,444	51,435	1239,1
100	18	1,52 (0,07)	0,031 (0,007)	1,782 (0,008)	0,271 (0,007)	5,336	46,228	1389,3
100	30	2,28 (0,02)	0,05 (0,01)	3,4 (0,1)	0,49 (0,01)	5,694	46,686	1163,8
150	5	11,7 (1,1)	0,01422 (0,00005)	2,7 (0,2)	0,216 (0,003)	5,619	50,806	1245,6

Tabla 4.11 (cont.)

T (°C)	tiempo (min)	<i>R_x</i> (mg g ⁻¹ muestra seca)				<i>R_{TPC}</i> (mg GAE mL ⁻¹)	<i>R_{ABTS}</i> (mM TE)	<i>R_{DPPH}</i> (µg mL ⁻¹ TE)
		Ácido sinrínico	7- <i>O</i> -Glucósido de luteolina	Ácido rosmarínico	Ácido salvianólico B			
150	18	12,4 (0,2)	0,00335 (0,00002)	1,36 (0,09)	0,082 (0,001)	5,960	56,0133	1300,5
150	30	12,0 (1,1)	0,0033 (0,0002)	1,15 (0,06)	0,0617 (0,0001)	5,569	46,0569	1120,3

*Valor medio y desviación estándar entre paréntesis (*n* = 3)

Estos resultados fueron similares a los obtenidos para maximizar el TPC, requiriéndose en este caso extracciones a 142 °C durante 20 min. Las condiciones óptimas que proporcionaron la mayor actividad antioxidante, medida tanto por el método del DPPH· como del ABTS⁺ fueron intermedias entre los casos anteriores, necesitándose 120 °C, 5 min y 128 °C, 18 min, repectivamente.

Finalmente, se consideró una respuesta múltiple que maximizara simultáneamente todas estas variables respuesta, obteniéndose como condiciones óptimas para la obtención de extractos multifuncionales por PLE una **temperatura de 120 °C** y un **tiempo de 5 min** ($R_D = 0,67$).

Tabla 4.12. Ecuaciones de los modelos y condiciones óptimas para la maximización independiente de cada una de las respuestas consideradas en el desarrollo de un del método por PLE para la obtención de extractos acuosos de *M. rotundifolia*.

Respuesta	Ecuación del modelo	Condiciones óptimas
<i>R</i> ácido siríntrico	$y = 5,90 - 0,19T + 1,56 \cdot 10^{-3}T^2$	150 °C, 30 min
<i>R</i> 7- <i>O</i> -glucósido de luteolina	$y = -0,111 + 0,003T - 0,165 \cdot 10^{-4}T^2$	98 °C, 18 min
<i>R</i> ácido rosmarínico	$y = -7,55 + 0,20T - 9,09 \cdot 10^{-4}T^2$	109 °C, 15 min
<i>R</i> ácido salvianólico B	$y = -1,23 + 0,03T - 1,60 \cdot 10^{-4}T^2$	103 °C, 16 min
<i>R</i> TPC	$y = 2,35 + 0,05T - 1,7 \cdot 10^{-4}T^2$	142 °C, 20 min
<i>R</i> DPPH	$y = 697,38 + 10,15T + 4,23t - 0,04T^2 - 0,04Tt - 0,11t^2$	120 °C, 5 min
<i>R</i> ABTS	$y = -33,808 + 1,366T - 0,005T^2$	128 °C, 18 min

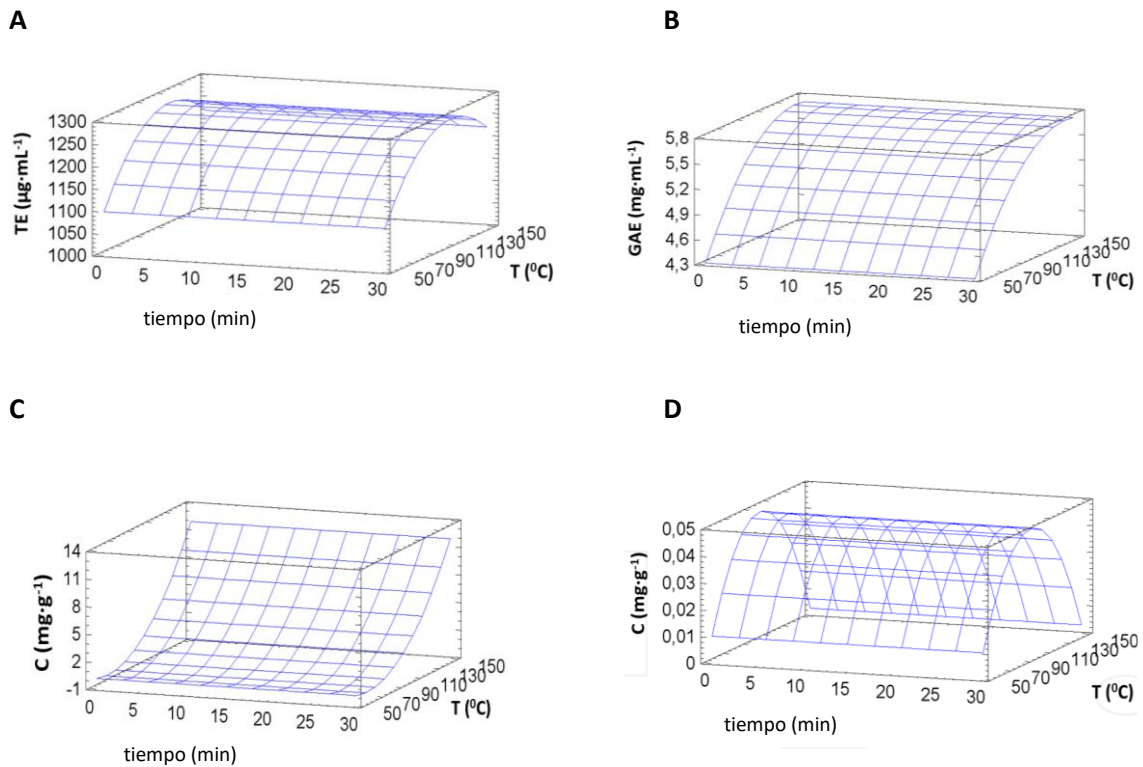


Fig 4.8 A) Superficie de respuesta para maximizar: A) la actividad antioxidante determinada por el método del DPPH; B) TPC; C) el contenido en ácido siríngico y D) el contenido de 7-*O*-glucósido de luteolina en los extractos PLE acuosos de *M. rotundifolia*.

Tras la selección de las condiciones más apropiadas de extracción por PLE, se evaluó el número de ciclos de extracción necesarios para llevar a cabo una extracción exhaustiva de los compuestos fenólicos presentes en esta matriz. Mientras que el ácido salvianólico B se extrajo en su totalidad en el primer ciclo de extracción, el ácido siríngico y rosmarínico se extrajeron únicamente al 67% y el 7-*O*-glucósido de luteolina al 39%. Fue necesario, por tanto, un segundo ciclo de extracción para alcanzar porcentajes cercanos al 90% de cada uno de los compuestos fenólicos considerados (90% de ácido siríngico, 83,7% de 7-*O*-glucósido de luteolina y 90,5% de ácido rosmarínico). En base a ello, las condiciones óptimas de extracción por **PLE** para la obtención de extractos acuosos multifuncionales fueron **120 °C, 5 min, 1 g de muestra seca/ 12 mL de agua y 2 ciclos de extracción.**

4.3.3.4. Comparación de las técnicas MAE y PLE para la obtención de extractos acuosos multifuncionales

Una vez optimizados los métodos de extracción por MAE y PLE para la obtención de extractos acuosos multifuncionales, se analizó una muestra de *M. rotundifolia* (MR17) con objeto de comparar ambos métodos. La **Tabla 4.13** muestra los resultados obtenidos en el análisis por HPLC-Q MS y la medida de la bioactividad de dichos extractos obtenidos en las condiciones óptimas de cada método de extracción.

Tabla 4.13. Concentraciones de compuestos fenólicos (mg g⁻¹ de muestra seca), TPC (mg GAE mL⁻¹) y actividad antioxidante por el método DPPH (mg TE mL⁻¹) de los extractos de MR17 obtenidos por MAE y PLE en condiciones óptimas.

Compuesto	MR17 MAE	MR17 PLE
	(100 °C, 14,7 min, 1 g muestra seca/ 12 mL de agua y 1 ciclo de extracción)	(120 °C, 5 min, 1 g de muestra seca/ 12 mL de agua y 2 ciclos de extracción)
Ácido siríngico	1,7 (0,7) ^{*a}	1,64 (0,03) ^a
Ácido rosmarínico	2,5 (0,1) ^a	0,63 (0,02) ^b
7- <i>O</i> -Glucósido de luteolina	0,02 (0,01) ^b	0,092 (0,004) ^a
Ácido salvianólico B	0,5 (0,1) ^a	0,41 (0,01) ^a
TPC (mg GAE mL ⁻¹)	4,05 (0,06) ^a	3,1 (0,2) ^b
DPPH (mg TE mL ⁻¹)	4,8 (0,2) ^a	4,99 (0,17) ^a

*Valor medio y desviación estándar entre paréntesis ($n = 3$). ^{a,b} Distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) para cada compuesto entre las distintas técnicas.

En general, no se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de los compuestos extraídos por ambos métodos, a excepción del ácido rosmarínico del que se encontró una concentración 4 veces superior en los extractos obtenidos mediante MAE y del 7-*O*-glucósido de luteolina que fue más abundante en el extracto obtenido por PLE. Por otra parte, el contenido en compuestos fenólicos totales fue superior en el extracto obtenido por MAE, sin embargo, la actividad antioxidante (determinada por el método del DPPH) fue similar en ambos extractos. En cuanto a las condiciones de extracción, el método por MAE empleó temperaturas ligeramente inferiores al método por PLE (100 °C vs. 120 °C) que pueden ser más apropiadas para evitar la degradación de compuestos termolábiles. Por el contrario, el tiempo de extracción (considerando los

ciclos necesarios) fue superior en MAE que en PLE (14,7 min vs. 10 min), aunque el volumen de disolvente requerido, y que debe ser posteriormente eliminado para la conservación del extracto, fue menor en la primera técnica (12 mL vs. 25 mL). Por todos estos motivos, se seleccionó el método por MAE para los estudios posteriores, aunque ambas técnicas resultan prometedoras para la obtención de extractos bioactivos a partir de hojas de menta.

4.3.3.5. Aplicación del método MAE optimizado a distintas especies de menta

Las condiciones óptimas de extracción por MAE (100 °C, 14,7 min, 1g muestra/12 mL de agua y 1 ciclo) se aplicaron para la obtención de extractos acuosos multifuncionales a partir de hojas de menta de diferentes especies (MR17, MSp, MS, ML, MP, MC; ver **Tabla 4.2**). La composición química de estos extractos obtenidos se determinó mediante HPLC-QToF MS, mientras que el análisis cuantitativo de los compuestos mayoritarios se realizó por HPLC-Q MS.

4.3.3.5.1. Análisis cualitativo de compuestos fenólicos

A pesar de que muchos compuestos fenólicos se encuentran como glicósidos en plantas, y se han descrito estudios con procedimientos experimentales que incluyen el uso de agentes hidrolizantes en la extracción o que están dedicados fundamentalmente al análisis de compuestos fenólicos glicosilados (Proestos y col., 2005), en esta tesis nos hemos centrado en el estudio de la composición de los extractos originales obtenidos por MAE, sin ningún tratamiento adicional.

La **Tabla 4.14** muestra los tiempos de retención, el ión cuasimolecular $[M-H]^-$ y los fragmentos de MS/MS característicos registrados en modo negativo de los compuestos fenólicos y ácidos detectados en los extractos de las distintas muestras de menta. Se identificó un total de 42 compuestos, siendo 16 de ellos identificados de forma inequívoca mediante el uso de patrones comerciales. El resto de compuestos se identificaron tentativamente por comparación de sus espectros de MS y MS/MS con los descritos en la bibliografía o en la base de datos Metlin.

Tabla 4.14. Compuestos detectados en los extractos MAE de distintas especies de menta: *M. spicata* (MSp), *M. pulegium* (MP), *M. cervina* (MC), *M. longifolia* (ML), *M. rotundifolia* (MR) y *M. suaveolens* (MS).

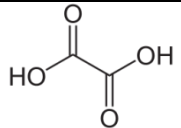
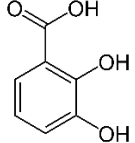
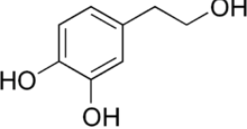
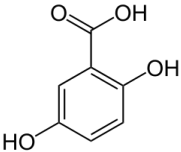
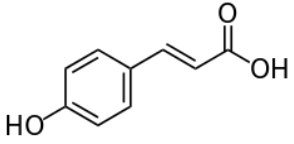
Compuesto	Fórmula molecular	Estructura química	Identificación				Muestras					
			t_R (min)	[M-H] ⁻	MS/MS	Confirmación de la estructura	MSp	MP	MC	ML	MR	MS
Ácido oxálico	C ₂ H ₂ O ₄		0,72	89	61/43	St, MS/MS	√	√	√	√	√	√
Ácido 4-hidroxibenzoico	C ₇ H ₆ O ₃		5,79	137	108 /91	MS/MS	-	√	√	√	√	√
3-Hidroxitirosol	C ₈ H ₁₀ O ₃		3,6	153	109/69/53	St, MS/MS	-	-	√	√	-	√
Ácido gentísico	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁		3,6	153	109	MS/MS	-	-	√	√	-	-
Ácido <i>p</i> -cumárico	C ₉ H ₈ O ₃		10,51	163	119/91	St, MS/MS	√	√	√	√	-	√

Tabla 4.14 (cont.)

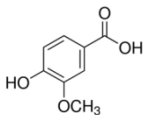
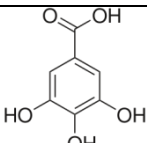
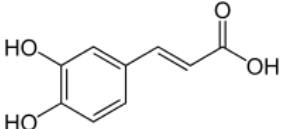
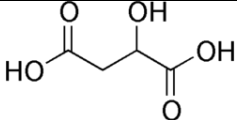
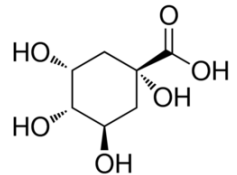
Compuesto	Fórmula molecular	Estructura química	Identificación				Muestras					
			t_R (min)	[M-H] ⁻	MS/MS	Confirmación de la estructura	MSp	MP	MC	ML	MR	MS
Ácido vanílico	C ₈ H ₈ O ₄		7,6	167	152/108	St, MS/MS	-	√	√	√	-	-
Ácido gálico	C ₇ H ₆ O ₅		0,9	169	125/79	St, MS/MS	-	√	-	-	-	-
Ácido cafeico	C ₉ H ₈ O ₄		8,0	179	135/79	St, MS/MS	√	-	√	√	√	√
Ácido cítrico	C ₄ H ₆ O ₅		1,4	191	111/87 /57	St, MS/MS	√	√	√	-	-	√
Ácido quínico	C ₇ H ₁₂ O ₆		1,7	191	111/127 /87/85	St, MS/MS	-	√	√	-	√	-

Tabla 4.14 (cont.)

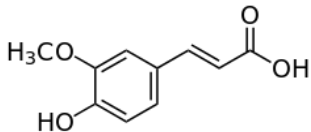
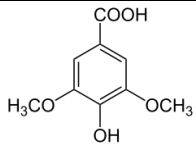
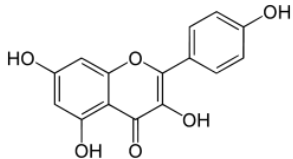
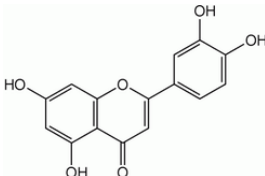
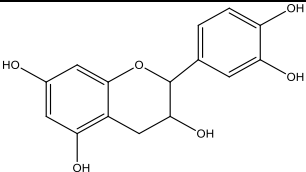
Compuesto	Fórmula molecular	Estructura química	Identificación				Muestras					
			t_R (min)	[M-H] ⁻	MS/MS	Confirmación de la estructura	MSp	MP	MC	ML	MR	MS
Ácido ferúlico	C ₁₀ H ₁₀ O ₄		12,6	193	178/134 /77	St, MS/MS	√	√	√	-	-	-
Ácido siríngico	C ₉ H ₁₀ O ₅		2,2	197	179/135 /72	St, MS/MS	√	-	√	√	√	-
Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆		15,5	285	-	MS/MS	-	√	-	√	√	√
Luteolina	C ₁₅ H ₁₀ O ₆		18,2	285	199/133 /65	St, MS/MS	√	√	-	√	√	√
Isómero de catequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆		12,2	289	245/203	MS/MS	√	√	√	√	√	√

Tabla 4.14 (cont.)

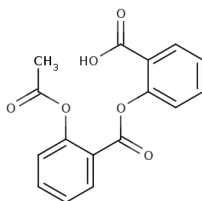
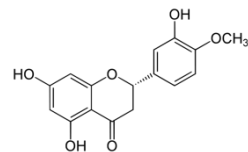
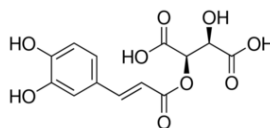
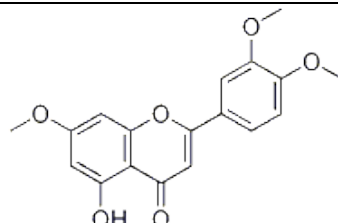
Compuesto	Fórmula molecular	Estructura química	Identificación				Muestras					
			t_R (min)	[M-H] ⁻	MS/MS	Confirmación de la estructura	MSp	MP	MC	ML	MR	MS
Diplosalsalato	C ₁₆ H ₁₂ O ₆		5,75	299	137/93	MS/MS	√	-	-	-	√	√
Hesperetina	C ₁₆ H ₁₄ O ₆		22,8	301	286/242/164	MS/MS	√	√	√	√	√	√
Isómero de galocatequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₇		12,5	305	225/96/59	MS/MS	√	√	√	√	√	√
Ácido caftárico	C ₁₃ H ₁₂ O ₉		3,1	311	179/149/135/87	MS/MS	√	√	-	√	-	√
5-Hidroxi-3',4',7-trimetoxiflavona	C ₁₈ H ₁₆ O ₆		20,91	327	291/211/171	MS	√	√	√	√	√	√

Tabla 4.14 (cont.)

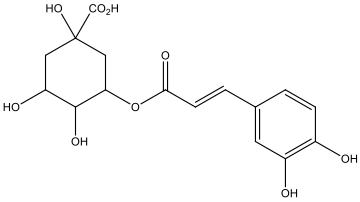
Compuesto	Fórmula molecular	Estructura química	Identificación				Muestras					
			t_R (min)	[M-H] ⁻	MS/MS	Confirmación de la estructura	MSP	MP	MC	ML	MR	MS
Ácido clorogénico	C ₁₆ H ₁₈ O		7,3	353	191/179 /135	St, MS/MS	√	√	√	√	√	√
Isómero del ácido clorogénico	C ₁₆ H ₁₈ O		5,4	353	191/179 /135	MS/MS	√	√	√	√	√	√
Isómero del ácido clorogénico	C ₁₆ H ₁₈ O		8,0	353	191/179 /135	MS/MS	√	√	√	√	√	√

Tabla 4.14 (cont.)

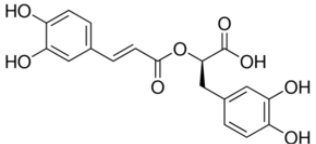
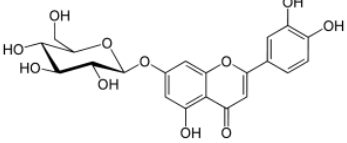
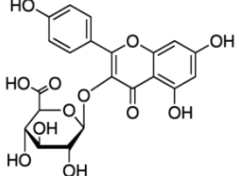
Compuesto	Fórmula molecular	Estructura química	Identificación				Muestras					
			t_R (min)	[M-H] ⁻	MS/MS	Confirmación de la estructura	MSP	MP	MC	ML	MR	MS
Ácido rosmarínico	C ₁₈ H ₁₆ O ₈		14,6	359	197/179 /161	St, MS/MS	√	√	√	√	√	√
Glucósido de luteolina	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁		12,2	447	285	St, MS/MS	√	√	√	√	√	√
Kaempferol-3-O-glucurónido	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁		13,55	461	285	MS/MS	√	-	-	√	√	√
Isómero del kaempferol-3-O-glucurónido	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁		17,10	461	285	MS/MS	√	-	-	-	√	√

Tabla 4.14 (cont.)

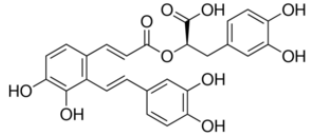
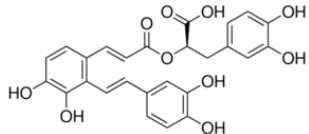
Compuesto	Fórmula molecular	Estructura química	Identificación				Muestras					
			t_R (min)	[M-H] ⁻	MS/MS	Confirmación de la estructura	MSp	MP	MC	ML	MR	MS
Isómero del ácido salvianólico A	C ₂₆ H ₂₂ O ₁₀		18,8	493	295/197 /161	MS/MS	√	-	-	-	√	√
Isómero del ácido salvianólico A	C ₂₆ H ₂₂ O ₁₀		19,2	493	295/197 /161	MS/MS	-	-	-	-	√	√
Isómero del ácido salvianólico A	C ₂₆ H ₂₂ O ₁₀		19,97	493	295/197 /161	MS/MS	-	√	√	-	√	-
Isómero del ácido salvianólico A	C ₂₆ H ₂₂ O ₁₀		20,1	493	295/197 /161	MS/MS	√	√	√	-	-	√

Tabla 4.14 (cont.)

Compuesto	Fórmula molecular	Estructura química	Identificación				Muestras					
			t_R (min)	[M-H] ⁻	MS/MS	Confirmación de la estructura	MSp	MP	MC	ML	MR	MS
Isómero I del ácido litospérmico	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₂		18,4	537	493/359 /161/19 7	MS/MS	√	-	-	-	-	√
Isómero II del ácido litospérmico	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₂		19,2	537	493/359 /161/19 7	MS/MS	√	-	-	-	-	√
Isómero III del ácido litospérmico	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₂		19,9	537	359/161 /197	MS/MS	√	-	-	-	√	√

Tabla 4.14 (cont.)

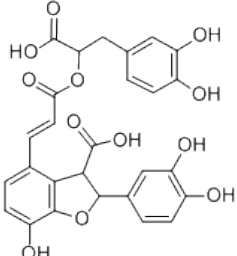
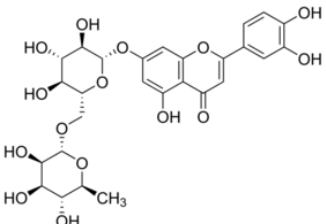
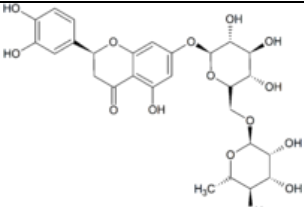
Compuesto	Fórmula molecular	Estructura química	Identificación				Muestras					
			t_R (min)	[M-H] ⁻	MS/MS	Confirmación de la estructura	MSP	MP	MC	ML	MR	MS
Isómero IV del ácido litospérmico	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₂		20,8	537	359/161 /197	MS/MS	√	-	√	-	-	√
Rutinósido de luteolina	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅		21,1	593	285	MS/MS	√	√	√	√	√	√
Eriocitrina	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₅		12,0	595	287/151	MS/MS	√	-	-	√	-	-

Tabla 4.14 (cont.)

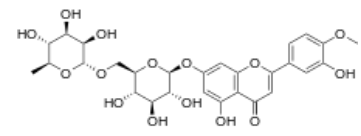
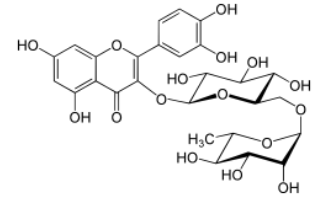
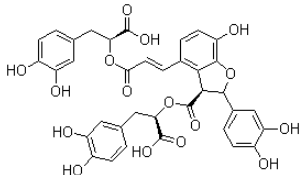
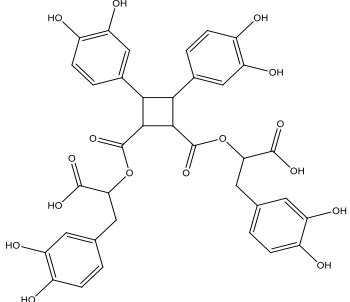
Compuesto	Fórmula molecular	Estructura química	Identificación				Muestras					
			t_R (min)	[M-H] ⁻	MS/MS	Confirmación de la estructura	MSp	MP	MC	ML	MR	MS
Diosmina	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅		19,13	607	299	MS/MS	√	-	-	-	-	-
Rutina	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆		12,5	609	300	St, MS/MS	√	-	-	-	√	-
Isómeros ácido salvianólico B o E	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆		16,6	717	519/321	MS/MS	√	-	√	-	-	-

Tabla 4.14 (cont.)

Compuesto	Fórmula molecular	Estructura química	Identificación				Muestras					
			t_R (min)	[M-H] ⁻	MS/MS	Confirmación de la estructura	MSp	MP	MC	ML	MR	MS
Isómeros ácido salviánico B o E	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆		17,8	717	519/321	MS/MS	√	-	-	-	√	-
Ácido salviánico B	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆		18,4	717	519/321	St, MS/MS	√	√	√	√	√	-
Ácido sagerínico	C ₃₆ H ₃₂ O ₁₆		14,5	719	359/161	MS/MS	-	√	√	-	√	√

√: presencia, -: ausencia. St: patrón comercial disponible; MS/MS: confirmación con datos de MS en tándem según datos bibliográficos: Nuengchamng y col. (2011), Metlin, Santos y col. (2014), Taamalli y col. (2015), Tine y col., (2017).

Aunque muchos de estos compuestos ya se han descrito en extractos de hojas de algunas especies de menta (en *M. spicata*, Cilini y col., 2016; en *M. viridis* y *M. cervina*, Miguel y col., 2016; en *M. rotundifolia*, Benedec y col., 2013), en este estudio se han detectado un gran número de compuestos en seis especies diferentes extraídas en las mismas condiciones, pudiéndose realizar una comparativa real de la presencia o ausencia de cada compuesto dependiendo de la especie de menta. Mientras que algunos compuestos como el ácido oxálico o el isómero de catequina se detectaron en todas las especies de menta, la mayor parte de los compuestos sólo se detectaron en algunas especies. Así, por ejemplo, en los extractos de *M. longifolia* y *M. cervina* se observó un mayor número de compuestos de bajo peso molecular (e.g. ácido oxálico, ácido dihidroxibenzoico, 3-hidroxitirosol, ácido gentísico, etc.), mientras que en los extractos de *M. spicata* se detectaron compuestos como la eriocitrina, diosmina, rutina, etc., de mayor peso molecular.

Entre los ácidos fenólicos descritos en hojas de menta, es de destacar el ácido cafeico y sus derivados (Pereira y Cardoso, 2013). Aunque la presencia de este ácido se ha descrito en distintas especies de menta, son realmente sus formas diméricas (ácido rosmarínico) y triméricas (ácido litospérmico) los ácidos fenólicos más característicos del género *Mentha* sp. En este trabajo, el ácido cafeico y el rosmarínico se han detectado en todas las especies de menta estudiadas, a excepción del ácido cafeico en la *M. pulegium*. En cuanto al ácido litospérmico, se han detectado distintos isómeros del mismo principalmente en *M. spicata* y *M. suaveolens*. El ácido clorogénico y sus isómeros, derivados del ácido cafeico, se detectaron también en todos los extractos obtenidos, mientras que otros derivados como el ácido caftárico o los distintos isómeros del ácido salvianólico sólo se observaron en algunas especies como se muestra en la **Tabla 4.14**. Además de los derivados del ácido cafeico, en los extractos analizados se han detectado otros ácidos como el ácido gentísico, cinámico, etc.

En cuanto a los flavonoides, los más característicos de las hojas de menta son las flavonas y entre ellas, la luteolina y sus derivados (Pereira y Cardoso, 2013). Tanto la luteolina como el glucósido de luteolina y el rutinósido de luteolina se detectaron en prácticamente todas las muestras analizadas en este estudio, aunque con diferentes abundancias. Sin embargo, la apigenina, flavona descrita en algunas especies de menta como la *M. arvensis* (Misan y col., 2011) o la *M. piperita* (Kosar y col., 2004), o flavanonas como la naringina descrita en extractos de *M. spicata* (Proestos y col., 2005;

Moldovan y col., 2014; Brahmi y col., 2015), no fueron detectadas en estos extractos. Sin embargo, sí que se observó la presencia de otras flavanonas como la eriocitrina en *M. spicata* y *M. longifolia* y de flavonoles como el kaempferol en *M. pulegium*, *M. longifolia*, *M. rotundifolia* y *M. suaveolens*.

4.3.3.5.2. Análisis cuantitativo de compuestos fenólicos

Aunque en la bibliografía pueden encontrarse diversos trabajos en los que se indica el contenido de compuestos fenólicos totales en extractos tanto acuosos como orgánicos, de diferentes especies de menta obtenidos tanto por SLE como por PLE (Ahmad N. y col., 2011; Stagos y col., 2012), los estudios relativos a la concentración individual de dichos compuestos determinada por HPLC no son muy abundantes. La **Tabla 4.15** muestra las concentraciones (mg g^{-1} de muestra seca) de los compuestos fenólicos y ácidos mayoritarios de los extractos obtenidos por MAE de las distintas muestras de menta estudiadas. A modo de ejemplo, la **Figura 4.9** muestra el perfil de HPLC-Q MS registrado en modo SIM de algunos de los compuestos detectados en el extracto de *Mentha rotundifolia*. En general, la composición de los extractos MAE obtenidos fue diferente en función de la especie de menta considerada. La *M. longifolia* y la *M. rotundifolia* fueron las que presentaron menores concentraciones de estos compuestos ($4,20$ y $6,99 \text{ mg g}^{-1}$ de muestra seca, respectivamente), mientras que la *M. suaveolens* fue la que mostró las mayores concentraciones ($123,40 \text{ mg g}^{-1}$ de muestra seca).

La *M. spicata* fue la que presentó mayor concentración de ácido rosmarínico ($4,4 \text{ mg g}^{-1}$ de muestra seca), tal y como describen algunas referencias previas (Dorman y col., 2003; Rita y col., 2016), seguida por *M. cervina* ($3,2 \text{ mg g}^{-1}$ de muestra seca) y *M. rotundifolia* ($2,5 \text{ mg g}^{-1}$ de muestra seca) y el ácido 4-hidroxibenzoico fue más abundante en *M. cervina* ($4,4 \text{ mg g}^{-1}$ de muestra seca) seguida por *M. suaveolens* ($12,1 \text{ mg g}^{-1}$ de muestra seca).

Además de su alto contenido en ácido rosmarínico, el perfil fenólico del extracto MAE de *M. rotundifolia* obtenido se caracterizó por las altas concentraciones de ácido siríngico y de ácido salvianólico A ($1,7$ and $1,2 \text{ mg g}^{-1}$ de muestra seca, respectivamente), en comparación con el resto de especies de menta analizadas en este estudio.

Tabla 4.15. Concentración (mg g⁻¹ de muestra seca) de compuestos fenólicos mayoritarios en los extractos MAE de las distintas especies de menta estudiadas.

Compuesto	<i>M. spicata</i>	<i>M. pulegium</i>	<i>M. cervina</i>	<i>M. longifolia</i>	<i>M. rotundifolia</i> (MR17)	<i>M. suaveolens</i>
4-hydroxibenzoico acid	-	0,45 (0,09)*	4,36 (0,07)	3,7 (0,4)	0,69 (0,02)	12,1 (0,9)
3-hidroxitirosol	-	-	0,033 (0,004)	0,0243 (0,0004)	-	0,033 (0,005)
ácido <i>p</i>-coumarico	tr	tr	tr	0,030 (0,001)	-	0,15 (0,06)
ácido vanílico	-	0,0122 (0,0003)	0,03 (0,01)	0,05 (0,04)	-	-
ácido cafeico	0,020	-	tr	0,010 (0,004)	0,043 (0,008)	0,014 (0,001)
ácido cítrico	27,0 (5,9)	19,5 (0,6)	0,54 (0,04)	-	-	109,1 (8,9)
ácido quínico	-	0,092 (0,009)	0,08 (0,01)	-	0,15 (0,02)	-
ácido ferúlico	tr	tr	tr	-	-	-
ácido siríngico	0,5 (0,1)	-	4,1 (0,9)	0,14 (0,05)	1,7 (0,7)	-
luteolina	0,0005	0,0002 (0,0001)	-	0,0003 (0,0002)	tr	0,00016
ácido clorogénico	0,020	0,009 (0,001)	0,016 (0,005)	0,006 (0,001)	0,0033 (0,0007)	tr
ácido rosmarínico	4,4 (0,8)	0,15 (0,01)	3,2 (0,9)	0,22 (0,01)	2,5 (0,1)	1,7 (0,5)
luteolin-7-<i>O</i>- glucósido	0,004	0,00003 (0,00001)	-	-	0,002 (0,002)	-
ácido salvianólico A	-	0,019 (0,001)	0,4 (0,1)	-	1,2 (0,2)	-
ácido salvianólico B	0,66 (0,05)	0,0126 (0,0002)	tr	0,0204 (0,0002)	0,5 (0,1)	-
ácido sagerínico	-	0,026 (0,001)	0,4 (0,1)	-	0,2 (0,1)	0,3 (0,1)

*Media y desviación estándar entre paréntesis, -: no detectado, tr: trazas

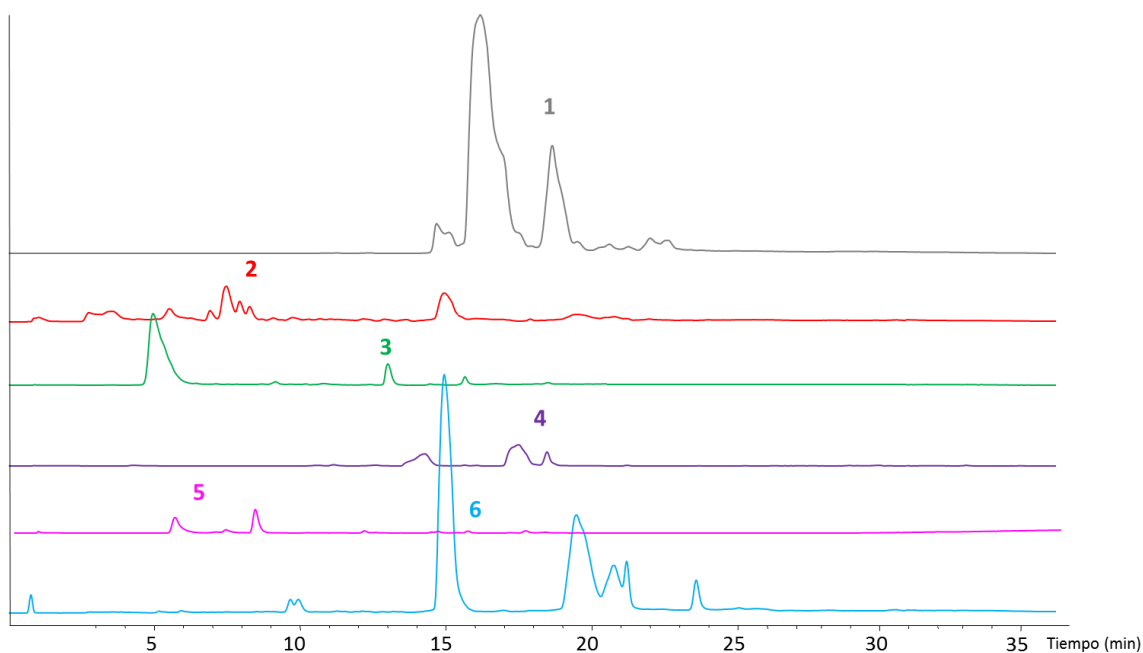


Figura 4.9. Perfil de compuestos fenólicos presentes en el extracto de *Mentha rotundifolia* obtenido por HPLC-Q MS. 1) Ácido salvianólico B e isómeros, 2) Ácido cafeico, 3) 7-*O*-glucósido de luteolina, 4) Luteolina, 5) Ácido clorogénico, 6) Ácido rosmarínico.

Entre las distintas especies de menta consideradas, la *M. suaveolens* presentó las mayores concentraciones de ácido 4-hidroxibenzoico, altas concentraciones de ácido *p*-cumárico ($0,15 \text{ mg g}^{-1}$ de muestra seca) y niveles intermedios de ácido rosmarínico, similares a los contenidos en el extracto de *M. rotundifolia* (MR17). Las concentraciones de otros compuestos característicos de los extractos etanólicos de *M. suaveolens*, como la luteolina o el ácido cafeico (Moldovan y col., 2014), presentaron bajas concentraciones ($<0,014 \text{ mg g}^{-1}$ de muestra seca).

En cuanto a la composición de los extractos MAE acuosos de *M. cervina*, se encontraron concentraciones en el rango de $3\text{-}4 \text{ mg g}^{-1}$ de muestra seca de ácido 4-hidroxibenzoico, ácido sirínico y ácido rosmarínico. El ácido salvianólico A y el ácido sagerínico estaban también presentes en concentraciones moderadas en éste extracto ($0,4 \text{ mg g}^{-1}$ muestra seca). Son pocas las referencias bibliográficas existentes sobre la composición en compuestos fenólicos de extractos de hojas de menta de esta especie (Politi y col., 2008; Miguel y col., 2016). En estos trabajos se ha descrito la presencia de la mayoría de los compuestos extraídos por MAE a excepción de los ácidos sirínico, hidroxibenzoico y vanílico.

En contraste con otras especies de menta, en los extractos MAE de *M. longifolia* y *M. pulegium* obtenidos en el presente trabajo se encontraron niveles de ácido rosmarínico muy bajos (0,22 y 0,15 mg g⁻¹ de muestra seca, respectivamente). Bahadori y col. (2018) encontraron resultados opuestos a los aquí obtenidos en muestras de *M. longifolia* recogidas en Irán, donde el ácido rosmarínico fue el compuesto mayoritario encontrado, y sin embargo, no se detectó el ácido *p*-hidroxibenzoico. De forma similar, Krzyzanowska y col. (2011) determinaron concentraciones de ácido rosmarínico de 1,9 mg g⁻¹ de *M. longifolia* seca recogida en Polonia. Estas diferencias pueden ser debidas a diversos factores como el origen geográfico, periodo de recogida, etc. Dada la limitación de estudios referentes a la composición fenólica de esta especie de menta y a la variedad de compuestos determinados en los trabajos existentes, no han podido realizarse otras comparaciones.

El extracto MAE de *M. pulegium* presentó como compuestos fenólicos mayoritarios el ácido 4-hidroxibenzoico y el ácido rosmarínico (0,45 y 0,15 mg g⁻¹ de muestra seca, respectivamente), seguidos por el ácido sagerínico (0,03 mg g⁻¹ de muestra seca) y el ácido salvianólico B (0,013 mg g⁻¹ de muestra seca). Una composición similar fue también descrita por Brahmi y col. (2015) para extractos etanólicos de esta misma especie cultivada en Algeria. Sin embargo, Proestos y col. (2005) determinaron altos contenidos de ácido ferúlico, apigenina y ácido cafeico en extractos de *M. pulegium* hidrolizados, compuestos no detectados o detectados a nivel trazas en los extractos analizados. Esta discrepancia es posiblemente debida a que estos compuestos fenólicos procederían de glicosidos que fueron hidrolizados en un proceso de preparación de muestra que no ha sido llevado a cabo en nuestro estudio.

Por otro lado, los extractos de *M. spicata*, *M. pulegium* y *M. suaveolens*, principalmente este último (109,1 mg g⁻¹ de muestra seca), presentaron altas concentraciones de ácido cítrico.

Los resultados obtenidos para el contenido en compuestos fenólicos de muestras de *M. rotundifolia* de distintas anualidades (2014-2017, MR14, MR15, MR16 y MR17), se muestran en la **Tabla 4.16**. En general, no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de los compuestos extraídos en las muestras de *M. rotundifolia* de las distintas anualidades. Únicamente, se observaron cambios significativos en el contenido de ácido rosmarínico, que se encontró en mayor concentración en MR14 (4,16

mg g⁻¹ de muestra seca), disminuyendo su concentración en las muestras recogidas en los años posteriores hasta alcanzar casi la mitad de su concentración en MR17 (2,5 mg g⁻¹ de muestra seca). De formas similar, Papageorgiou y col. (2008) no observaron variaciones notables en la concentración de algunos compuestos fenólicos de extractos de distintas muestras de *Mentha viridis* L. recogidas en diferentes estaciones de un mismo año.

Tabla 4.16. Concentración (mg g⁻¹ de muestra seca) de compuestos fenólicos mayoritarios en los extractos MAE de las muestras de *Mentha rotundifolia* de distintas anualidades.

Compuesto	MR14	MR15	MR16	MR17
Ácido cafeico	0,059 (0,006) ^{* a}	0,06 (0,01) ^a	0,039 (0,005) ^a	0,043 (0,008) ^a
Ácido clorogénico	0,004 (0,001) ^a	0,0044 (0,0003) ^a	0,0032 (0,0003) ^a	0,0033 (0,0007) ^a
Ácido rosmarínico	4,16 (0,02) ^c	3,62 (0,02) ^{b,c}	3,36 (0,04) ^b	2,5 (0,1) ^a
7-O-Glucósido de luteolina	0,017 (0,001) ^a	0,0182 (0,0002) ^a	0,018 (0,002) ^a	0,02 (0,01) ^a
Ácido salvianólico B	0,49 (0,01) ^a	0,32 (0,02) ^a	0,345 (0,001) ^a	0,5 (0,1) ^a

* Media y desviación estándar entre paréntesis ^{a-c} Distintas letras en una misma fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre extractos de *M. rotundifolia* de distintas anualidades

4.3.3.5.1. Actividad antimicrobiana

La **Tabla 4.17** muestra los halos de inhibición del crecimiento de las bacterias Gram (+) (*Staphylococcus aureus*) y Gram (-) (*Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*) y de la levadura *Candida albicans*, en presencia de los extractos MAE de las distintas especies de menta, determinado según se indica en el apartado 4.2.7 de esta Memoria. Se consideró tanto el efecto bactericida como bacteriostático de cada extracto para las distintas cepas. Es conocido que las actividades antimicrobiana y antifúngica dependen de la especie de menta considerada (Proestos col., 2005; Moldovan y col., 2014). Aunque está descrito que las bacterias Gram (-) son más resistentes que las Gram (+) a las propiedades antibacterianas de los aceites esenciales y de los extractos de plantas (Gulluce y col., 2007; Riahi y col., 2013), los extractos MAE aquí obtenidos bajo condiciones óptimas no mostraron una actividad selectiva en base a las diferencias entre las membranas celulares de los distintos microorganismos bacterianos ensayados. Así, mientras que los extractos MAE de todas las especies de menta evaluadas, excepto el de *M. rotundifolia* (MR17), presentaron una actividad moderada frente a *E. coli* (con una media de halo de inhibición del crecimiento bacteriano de 1,0 cm), los extractos de *M. cervina*, *M. suaveolens* y *M. pulegium* fueron los únicos que mostraron un efecto bacteriostático (2,4-2,6 cm de halo).

Los extractos de todas las especies de menta estudiadas, excepto el de *M. suaveolens*, fueron activos frente a *S. aureus* (halo de inhibición en el rango de 1,0-1,7 cm). Los extractos de *M. rotundifolia* (MR17) y *M. spicata* fueron los más activos en la inhibición de este microorganismo, efecto que había sido ya observado por Moldovan y col. (2014) en estas especies de menta. Además, *M. pulegium* y *M. cervina* fueron las únicas muestras que presentaron un adicional efecto bacteriostático frente a *S. aureus*, sin diferencias significativas en la actividad determinada para ambos extractos (halos de inhibición de 3,2-3,3 cm). Ningún extracto de menta de los evaluados provocó la inhibición del crecimiento de *S. typhimurium*, mientras que el extracto de *M. cervina* fue el único que resultó activo frente a *C. albicans* (con un halo de inhibición de 1,7 cm).

Aunque en menor medida que los aceites esenciales descritos en la bibliografía para diferentes especies de menta (Gulluce y col., 2007; Riahi y col., 2013), los extractos obtenidos por MAE resultaron activos frente a diferentes cepas microbianas y levaduras, siendo la *M. pulegium* y *M. cervina* las que mostraron un espectro más amplio de

inhibición. Comparando los extractos metanólicos de *Mentha longifolia* obtenidos por Soxhlet (Gulluce y col., 2007), con los extractos acuosos de *M. longifolia* y *M. pulegium* obtenidos por extracción acelerada con disolventes (Stagos y col., 2012) y con los extractos de *M. spicata*, *M. suaveolens* y *M. rotundifolia* obtenidos por extracción convencional con etanol al 70% (Moldovan y col., 2014), los extractos MAE acuosos aquí obtenidos presentaron una actividad antimicrobiana similar.

-Extractos multifuncionales de hojas de menta-

Tabla 4.17. Contenido total en compuestos fenólicos (TPC), actividad antioxidante (DPPH·) y antimicrobiana de los extractos obtenidos por MAE en las condiciones óptimas para las distintas muestras de *Mentha* sp. en estudio.

		<i>M. spicata</i>	<i>M. suaveolens</i>	<i>M. longifolium</i>	<i>M. pulegium</i>	<i>M. cervina</i>	<i>M. rotundifolia</i>
Efecto bactericida. Halo de inhibición del crecimiento (cm)	<i>E. coli</i>	1,00 (0,05) ^a	1,00 (0,05) ^a	1,00 (0,05) ^a	1,00 (0,05) ^a	1,00 (0,05) ^a	-
	<i>S. typhimurium</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>S. aureus</i>	1,35 (0,07) ^b	-	1,00 (0,05) ^a	1,00 (0,05) ^a	1,00 (0,05) ^a	1,7 (0,3) ^b
	<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	1,7 (0,3)	-
Efecto bacteriostático. Halo de inhibición del crecimiento (cm)	<i>E. coli</i>	-	2,4 (0,2) ^a	-	2,5 (0,3) ^a	2,6 (0,1) ^a	-
	<i>S. aureus</i>	-	-	-	3,2 (0,2) ^a	3,3 (0,3) ^a	-
TPC (mg GAE g⁻¹ de muestra seca)**		48 (1) ^c	34,0 (0,2) ^b	26,2 (0,7) ^b	18,7 (0,1) ^a	30,72 (0,07) ^b	48,6 (0,6) ^c
DPPH· (mg TE g⁻¹ de muestra seca)**		120 (9) ^c	69 (5) ^b	51 (4) ^a	55 (2) ^a	49 (7) ^a	57 (2) ^a
IC₅₀ (µg mL⁻¹)		99 (6)	118 (7)	247 (9)	359 (6)	150 (3)	168 (5)

* Desviación estándar entre paréntesis. ^{a-c} Distintas letras indican diferencias significativas (p<0.05) entre extractos de mentas de distintas especies.

**GAE: equivalentes de ácido gálico; TE: equivalentes de Trolox.

4.3.3.5.3. TPC y actividad antioxidante

El contenido en compuestos fenólicos totales y la actividad antioxidante empleando el método del DPPH· fueron evaluados en los extractos MAE de mentas de distintas especies (**Tabla 4.17**). Los extractos de *M. spicata* y *M. rotundifolia* mostraron valores de TPC (48 y 48,6 mg GAE g⁻¹ de muestra seca) significativamente superiores a los de las restantes especies estudiadas, siendo el extracto de *M. pulegium* el que presentó el valor más bajo (18,7 mg GAE g⁻¹ de muestra seca). En general, los extractos acuosos de MAE aquí obtenidos, mostraron valores superiores (en el rango de 18.7-48.6 mg GAE g⁻¹ de muestra seca) a los extractos etanólicos obtenidos por extracción convencional de tres especies diferentes de menta de Algeria (*M. rotundifolia*, *M. spicata* y *M. pulegium*) (4.6-12.0 mg GAE g⁻¹ de muestra seca) (Brahmi y col., 2015) o a los obtenidos por extracción con metanol al 62,5% en condiciones de reflujo a partir de diferentes plantas aromáticas de Grecia (1-21 mg GAE g⁻¹ dry sample), incluyendo *Mentha viridis* y *Mentha pulegium* (16,5 y 8,4 mg GAE g⁻¹ muestra seca, respectivamente) (Proestos y col., 2005).

Sin embargo, los resultados mostrados en la **Tabla 4.17** fueron del mismo orden que los datos descritos para extracciones convencionales de distintas mentas de Rumanía utilizando etanol al 70% (51-98 mg GAE g⁻¹ de muestra seca). De forma similar a los resultados encontrados en este estudio, las mayores concentraciones de compuestos fenólicos totales, se encontraron en *M. rotundifolia* seguida de *M. spicata* y *M. suaveolens* (Moldovan y col., 2014).

En cuanto a la actividad captadora de radicales DPPH· de los extractos, la mayor capacidad para capturar dicho radical se encontró para el extracto de *M. spicata* (120 mg TE g⁻¹ de muestra seca), seguida del extracto de *M. suaveolens* (69 mg TE g⁻¹ de muestra seca). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre el resto de muestras evaluadas (49-57 mg TE g⁻¹ muestra seca).

Es de destacar que, hasta el momento, no existen antecedentes bibliográficos sobre la optimización de un procedimiento por MAE para la extracción de compuestos bioactivos de menta en el que se evalúe la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos. La mayor parte de los estudios previos se basan en la determinación de la actividad de aceites esenciales de esta planta y los que evalúan la actividad antioxidante de extractos lo hacen de aquéllos extractos obtenidos por SLE (Gulluce y col., 2007; Moldovan y col., 2014). Además, los diferentes ensayos (DPPH·, ORAC (capacidad de absorbanza del radical oxígeno), FRAP (potencial antioxidante reductor del hierro) y los

patrones (Trolox, BHT, etc) empleados como referencia hacen también difícil la comparación de los resultados experimentales aquí obtenidos con los datos publicados. Por lo tanto, y con fines comparativos, se han expresado los resultados obtenidos en la **Tabla 4.17** en las unidades que son más frecuentemente utilizadas en la bibliografía (mg TE g^{-1} de muestra seca e IC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)).

Los datos de IC_{50} para extractos acuosos obtenidos por infusión y por SLE a partir de *Mentha cervina* (Miguel y col., 2016), y por esta última técnica a partir de *M. spicata* (Rita y col., 2016), fueron superiores (del orden de $210\text{-}810 \mu\text{g mL}^{-1}$) a los de los extractos MAE aquí obtenidos de las mismas especies de menta (**Tabla 4.17**), lo que supone una mayor actividad antioxidante de estos extractos MAE.

Por otro lado, los valores de IC_{50} determinados para los extractos MAE fueron entre 4-13 veces superiores a los del Trolox, patrón utilizado como control positivo (IC_{50} Trolox = $27 \mu\text{g mL}^{-1}$). Una actividad antioxidante similar (valores de IC_{50} en el rango de 4-16 veces superior del valor antioxidante del Trolox) ha sido previamente descrita para extractos etanólicos obtenidos a temperatura ambiente, durante 24 h, a partir de hojas de *M. spicata*, *M. pulegium* y *M. rotundifolia* recogidas en Algeria (Brahmi y col., 2015). Sin embargo, la capacidad de captación de radicales libres de extractos al 70% en etanol de diferentes especies de menta de Rumanía fue entre 9-24 veces menor (valores de IC_{50} en el rango de $105\text{-}285 \mu\text{g mL}^{-1}$) que la del Trolox (Moldovan y col. 2014).

Según estudios previos (Proestos y col., 2005; Gulluce y col., 2007; Rodríguez-Solana y col., 2015; Rita y col., 2016), la diversidad de las especies, las condiciones de cosecha y almacenamiento y la eficiencia de la extracción de los compuestos bioactivos pueden ser responsables de las variaciones observadas en cuanto al contenido en compuestos fenólicos totales y la actividad antioxidante de los extractos de menta.

Finalmente, aunque se observaron algunas similitudes entre los resultados de TPC y DPPH (e.g. datos para *M. spicata*), no se encontraron correlaciones significativas entre los resultados de estos dos ensayos ($R^2 = 0,37$). Por lo tanto, es probable que el tipo y concentración de compuestos fenólicos, así como la presencia de otros compuestos con actividad antioxidante en los extractos MAE, puedan ser responsables de esta falta de correlación. Resultados similares han sido previamente descritos por otros autores para estudios de actividad antioxidante de distintos tipos de muestras (Stagos y col., 2012; Proestos y col., 2005).

Por último, se evaluó la actividad antioxidante medida por el método del ABTS^{•+} (sección 4.2.7.2) para las distintas muestras de *M. rotundifolia* recolectadas en distintos años (**Tabla 4.18**). De forma similar al contenido en compuestos fenólicos (sección 4.3.3.5.2), no se observaron diferencias significativas en la actividad antioxidante proporcionada por los distintos extractos. Sin embargo, Ahmad I. y col. (2011) sí que observaron diferencias significativas en la actividad antioxidante de extractos de *M. longifolia* recogidos en distintas estaciones de un mismo año. Esto puede ser debido a que las muestras de *M. rotundifolia* aquí consideradas se recogieron en una misma estación del año (época de floración) y cultivadas de forma controlada. Sin embargo, para poder establecer conclusiones definitivas, sería necesario ampliar este estudio abordando el análisis de un mayor número de muestras.

Tabla 4.18. Actividad antioxidante (ABTS^{•+}) de los extractos obtenidos por MAE bajo las condiciones óptimas de las distintas muestras de *Mentha rotundifolia* recolectadas los años 2014-2017. TE: equivalentes de Trolox.

Muestra	ABTS (mM TE)
MR14	17,9 (2,2) ^{*a}
MR15	25,0 (0,9) ^a
MR16	20,6 (2,6) ^a
MR17	24,2 (1,8) ^a

*Media y desviación estándar entre paréntesis. ^a Distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre extractos de *M. rotundifolia* recogidas en distintos años.

En conclusión, se han optimizado métodos rápidos, eficaces y respetuosos con el medio ambiente (empleando etanol y agua como disolvente) mediante PLE y MAE para la obtención de extractos **multifuncionales** (con actividad antioxidante y antimicrobiana) de distintas especies de menta (*M. spicata*, *M. pullegium*, *M. suaveolens*, *M. longifolia*, *M. cervina* y *M. rotundifolia*) y de muestras de *M. rotundifolia* recogidas en distintas anualidades.

Por otra parte, los análisis llevados a cabo mediante GC-MS, HPLC-Q MS y HPLC-Q ToF-MS han permitido avanzar en el conocimiento de la composición, tanto cualitativa como cuantitativa, de dichos extractos, determinándose diversos compuestos por primera vez en varias de las especies de menta estudiadas.

Finalmente, es de destacar, que los extractos de menta aquí obtenidos presentan gran potencial para su uso como conservantes naturales en y/o como ingredientes alimentarios multifuncionales.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La extracción asistida por microondas, previamente optimizada (50 °C, 13 min, 0,5 g : 10 mL metanol, 1 ciclo) haciendo uso de un diseño experimental, ha demostrado ser una técnica rápida y eficaz para la obtención de extractos multifuncionales (con actividad antilipasa y antioxidante) a partir de corteza de abedul (*Betula* sp.).
2. El análisis por GC-MS ha permitido la caracterización multicomponente por primera vez de extractos MAE de corteza de distintas especies de abedul, requisito indispensable previo a su empleo como ingredientes multifuncionales.
3. La evaluación de la estabilidad, seguridad y bioactividad de los extractos MAE de abedul ha evidenciado lo prometedor de su empleo para el desarrollo de ingredientes alimenticios con carácter multifuncional.
4. Considerando un compromiso en cuanto al rendimiento y reproducibilidad en la extracción de terpenoides bioactivos a partir de hojas de *Mentha* sp., los extractos MAE etanólicos resultaron ventajosos frente a los obtenidos por SLE y UAE.
5. La optimización mediante un diseño de experimentos de las condiciones MAE (100 °C, 24 min, 1,5 g : 10 mL etanol, 1 ciclo) permitió obtener extractos multifuncionales (ricos en terpenoides bioactivos y con alto contenido en polifenoles totales) de *M. rotundifolia*.
6. El tratamiento posterior de extractos MAE etanólicos con AC permitió su enriquecimiento en terpenoides bioactivos, mejorando su aplicabilidad como conservante alimentario. Sin embargo, la actividad antioxidante de estos extractos fue menor, por lo que este tratamiento se descarta para aplicaciones orientadas a la obtención de ingredientes multifuncionales.
7. El análisis por GC-MS de la composición de extractos MAE etanólicos ha permitido determinar un total de 46 compuestos, algunos de ellos no descritos previamente en menta como distintos isómeros del neofitadieno.
8. La comparación de diferentes técnicas avanzadas (UAE empleando tanto sonda como baño, PLE y MAE) permitió seleccionar estas dos últimas como las más prometedoras para su posterior aplicación a la obtención de extractos acuosos multifuncionales de *Mentha* sp.
9. Una evaluación detallada basada en una respuesta múltiple permitió determinar las condiciones óptimas para la obtención de extractos MAE (100 °C, 14,7 min, 1 g : 12 mL agua, 1 ciclo) con actividad antimicrobiana y antioxidante y de extractos PLE (120 °C, 5 min, 1 g : 12 mL agua, 2 ciclos) ricos en compuestos fenólicos, siendo ambas técnicas prometedoras para la obtención de extractos bioactivos de menta.
10. Mediante el análisis por LC-Q MS y por LC-QToF MS, se han establecido las diferencias en cuanto a composición fenólica (hasta 42 compuestos) de extractos

MAE acuosos de distintas especies de menta y con diferente fecha de recogida, correlacionándose estos resultados con su bioactividad.

11. Los resultados de carácter multidisciplinar sobre la obtención y caracterización de extractos vegetales multifuncionales descritos en esta Tesis suponen una contribución destacable al desarrollo de nuevos ingredientes multifuncionales de aplicación en diversos campos dentro de un marco de producción sostenible, tema éste de gran repercusión científica, económica y social.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abu-Reidah I.M., Arráex-Román D., Warad I., Fernández-Gutiérrez A. (2017). UHPLC/MS²-based approach for the comprehensive metabolite profiling of bean (*Vicia faba* L.) by-products: A promising source of bioactive constituents. *Food Research International*, 93, 87-96.
- Abyshev A.Z., Agaev E.M., Guseinov, A.B. (2007). Studies of the chemical composition of birch bark extracts (*Cortex betula*) from the Betulaceae family. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 41, 419-423.
- Adams R.P. (2001). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy, Allured Publishing Co., Carol Stream, Illinois, USA.
- Ado M.A., Abas F., Mohammed A.S., Ghazali H.M. (2013). Anti- and pro-lipase activity of selected medicinal, herbal and aquatic plants, and structure elucidation of an anti-lipase compound. *Molecules*, 18, 14651-14669.
- Agcam E., Akyildiz A., Balasubramaniam V.M. (2017). Optimization of anthocyanins extraction from black carrot pomace with thermosonication. *Food Chemistry*, 237, 461-470.
- Ahmad N., Fazal H., Ahmad I., Abbasi B.H. (2011). Free radical scavenging (DPPH) potential in nine *Mentha* species. *Toxicology and Industrial Health*, 28, 83-89.
- Ahmad I., Sajid M., Ahmad A., Ashraf M., Hussain M., Ashraf M.Y. (2011). Seasonal variation in some medicinal and biochemical ingredients in *Mentha longifolia* (L.) Huds. *Pakistan Journal of Botany*, 43, 69-77.
- Aires A., Carvalho R., Saavedra M.J. (2016). Valorization of solid wastes from chestnut industry processing: Extraction and optimization of polyphenols, tannins and ellagitannins and its potential for adhesives, cosmetic and pharmaceutical industry. *Waste Management*, 48, 457-464.
- Akhtar M.H., Croteau L.G., Dani C., El-Sooud K.A. (1997). Development and validation of microwave-assisted extraction of fortified and incurred chloramphenicol residues in egg albumen and yolk. *Spectroscopy*, 13, 33-40.
- Alañón M.E., Ruiz-Matute A.I., Martínez-Castro I., Díaz-Maroto M.C., Pérez-Coello M.S. (2009). Optimization of pressurised liquid extraction for the determination of

- monosaccharides and polyalcohols in woods used in wine aging. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 2558-2564.
- Alara O.R., Abdurahman N.H., Ukaegbu C.I., Kabbashi, N.A. (2019). Extraction and characterization of bioactive compounds in *Vernonia amygdalina* leaf ethanolic extract comparing Soxhlet and microwave-assisted extraction techniques. *Journal of Taibah University for Science*, 13, 414–422.
- Arumugam P., Ramamurthy P., Ramesh, A. (2010). Antioxidant and cytotoxic activities of lipophilic and hydrophilic fractions of *Mentha spicata* L. (Lamiaceae). *International Journal of Food Properties*, 13, 23-31.
- Ashburner K., McAllister H.A. (2013). The Genus *Betula*: A Taxonomic Revision of Birches. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, UK.
- Azmir J., Zaidul I.S.M., Rahman M.M., Sharif K.M., Mohamed A., Sahena F., Jahurul M.H.A., Ghafoor K., Norulaini N.A.N., Omar A.K.M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117, 426–436.
- Babushok V.I., Zenkevich I.G. (2009). Retention indices for most frequently reported essential oil compounds in GC. *Chromatographia*, 69, 257-269.
- Bache M., Münch C., Güttler A., Wichmann H., Theuerkorn K., Emmerich D., Paschke R., Vordermark D. (2015). Betulinyl sulfamates as anticancer agents and radiosensitizers in human breast cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 26249–26262.
- Bahadori M.B., Zengin G., Bahadori S., Dinparast L., Movahhedin N. (2018). Phenolic composition and functional properties of wild mint (*Mentha longifolia* var. *calliantha* (Stapf) Briq.). *International Journal of food properties*, 21 (1), 198-208.
- Ballesteros-Vivas D., Alvarez-Rivera G., Ibañez E., Cifuentes A. (2019a). A multi-analytical platform based on pressurized-liquid extraction, *in vitro* assays and liquid chromatography/gas chromatography coupled to high resolution mass spectrometry for food by-products valorisation. Part 2: Characterization of bioactive compounds from goldenberry (*Physalis peruviana* L.) calyx extracts using hyphenated techniques. *Journal of Chromatography A*, 1584, 144-154.

- Ballesteros-Vivas D., Alvarez-Rivera G., Ibáñez E., Parada-Alfonso F., Cifuentes A. (2019b). Integrated strategy for the extraction and profiling of bioactive metabolites from *Passiflora mollissima* seed combining pressurized-liquid extraction and gas/liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1595, 144-157.
- Başer K.H.C., Demirci B. (2007). Studies on *Betula* essential oils. *Archive for Organic Chemistry*, 7, 335-348.
- Beelders T., Kalili K.M., Joubert E., De Beer D., de Villers A. (2012). Comprehensive two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of rooibos. *Journal of Separation Science*, 35, 1808-1820.
- Beereboom J.J. (1966). The synthesis of piperitenone via mesityl oxide and methyl vinyl ketone. *Journal of Organic Chemistry*, 31, 2026-2027.
- Belwal T., Ezzat S.M., Rastrelli L., Bhatt I.D., Daglia M., Baldi A., Devkota H.P., Orhan I.E., Patra J.K., Das G., Anandharamkrishnan C., Gómez-Gómez L., Nabavi S.F., Nabavi S.M., Atanasov A.G. (2018). A critical analysis of extraction techniques used for botanicals: Trends, priorities, industrial uses and optimization strategies. *Trends in Analytical Chemistry*, 100, 82-102.
- Benedec D., Vlase L., Oniga I., Mot A.C., Silghi-Dumitrescu R., Hanganu D., Tipericiu B., Crisan G. (2013). LC-MS analysis and antioxidant activity of phenolic compounds from two indigenous species of mentha. Note I. *Farmacia*, 61, 262-267.
- Berk Z. (2013). Extraction. En: *Food Process Engineering and Technology*. Academic Press-Elsevier, New York, USA.
- Beveridge T.H.J., Li T.S.C., Drover J.C.G. (2002). Phytosterol content in american ginseng seed oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 744-750.
- Birari R.B., Bhutani K.K. (2007). Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug Discovery Today*, 12, 879-889.
- Blois M.S. (1958). Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181, 1199-1200.

- Boonkird S., Phisalaphong C., Phisalaphong M. (2008). Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from *Capsicum frutescens* on a lab- and pilot-plant scale. *Ultrasonic Sonochemistry*, 15, 1075-1079.
- Bozin B., Mimica-Dukic N., Simin N., Anachov G. (2006). Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae species and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1822-1828.
- Božović M., Pirolli A., Ragno R. (2015). *Mentha suaveolens* Ehrh. (Lamiaceae) essential oil and its main constituent piperitenone oxide: biological activities and chemistry. *Molecules*, 20, 8605-8633.
- Brachet A., Rudaz S., Mateus L., Christen P., Veuthey, J. (2001). Optimisation of accelerated solvent extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves. *Journal of Separation Science*, 24, 865-873.
- Brada M., Bezzina M., Marlier M., Lognay G.C. (2006). Chemical composition of the leaf oil of *Mentha rotundifolia* (L.) from Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, 18, 663-665.
- Brahmi F., Khodir M., Mohamed C., Pierre D. (2017). Chemical composition and biological activities of mentha species. En: *Aromatic and Medicinal Plants – Back to Nature*, El-Shemy H. IntechOpen, Rijeka, Croacia.
- Brahmi F., Hauchard D., Guendouze N., Madani K., Kiendrebeogo M., Kamagaju L., Stévigny C., Chibane M., Duez, P. (2015). Phenolic composition, *in vitro* antioxidant effects and tyrosinase inhibitory activity of three Algerian *Mentha* species: *M. spicata* (L.), *M. pulegium* (L.) and *M. rotundifolia* (L.) Huds (Lamiaceae). *Industrial Crops & Products*, 74, 722–730.
- Bravo L. (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56, 317-333.
- Brennan J.G. (2006). *Food Processing Handbook*. Weinheim:Wiley-VCH, Wokingham, Berks, UK.
- Brokl M., Soria A.C., Martinez-Castro I., Sanz M.L., Ruiz-Matute A.I. (2009). Characterization of *O*-trimethylsilyl oximes of trisaccharides by gas

- chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216, 4689–4692
- Burt S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.
- Carabias-Martínez R., Rodríguez-Gonzalo E., Revilla-Ruiz P., Hernández-Méndez J. (2005). Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. *Journal of Chromatography A*, 1089, 1-17.
- Cárdenas-Baquero G.D., Arrazola-Paternina G., Villalba-Cadavid M. (2015). Frutas tropicales: fuente de compuestos bioactivos naturales en la industria de alimentos. *Ingenium*, 17, 29-40.
- Carrero-Carralero C., Mansukhani D., Ruiz-Matute A.I, Martínez-Castro I., Ramos L., Sanz M.L. (2018). Extraction and characterization of low molecular weight bioactive carbohydrates from mung bean (*Vigna radiata*). *Food Chemistry*, 266, 146-154.
- Carrero-Carralero C., Escobar-Arnanz J., Ros M., Jiménez-Falcao S., Sanz M.L., Ramos L. (2019). An untargeted evaluation of the volatile and semi-volatile compounds migrating into food simulants from polypropylene food containers by comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *Talanta*, 195, 800–806.
- Castro-López C., Ventura-Sobrevilla J.M., Gonzalez-Hernandez M.D. (2017). Impact of extraction techniques on antioxidant capacities and phytochemical composition of polyphenol-rich extracts. *Food Chemistry*, 237, 1139-1148.
- Castro-Vázquez L., Pérez-Coello, M.S., Cabezudo, M.D. (2003). Analysis of volatile compounds of rosemary honey. Comparison of different extraction techniques. *Chromatographia*, 57, 227-233.
- Chanmee W., Chaicharoenpong C., Petsom A. (2013). Lipase inhibitor from fruits of *Solanum stramonifolium* Jacq. *Food and Nutrition Sciences*, 4, 554-558.
- Chen F., Sun Y., Zhao G., Liao X., Hu X., Wu J., Wang Z. (2007). Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Ultrasonic Sonochemistry*, 14, 767-778.

- Chen G., Fang C., Chen X., Wang Z., Liu M., Kan J. (2019). High-pressure ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides from *Mentha haplocalyx*: Structure, functional and biological activities. *Industrial Crops & Products*, 130, 273-284.
- Chien-Hsing L., Guan-Cheng H., Chung-Yi C. (2017). Bioactive compounds from natural product extracts in Taiwan cosmeceuticals-Mini review. *Biomedical Research*, 28, 6561-6566.
- Cirlini M., Mena P., Tassotti M., Herrlinger K.A., Nieman K.M., Dall'Asta C., Del Río D. (2016). Phenolic and volatile composition of a dry spearmint (*Mentha spicata* L.) extract. *Molecules*, 21, 1-15.
- Co M., Koskela P., Eklund-Akergren P., Srinivas K., King J.W., Sjöberg P.J.R., Turner C. (2009). Pressurized liquid extraction of betulin and antioxidants from birch bark. *Green Chemistry*, 11, 668–674.
- Co M., Zettersten C., Nyholm L., Sjöberg P.J.R., Turner C. (2012). Degradation effects in the extraction of antioxidants from birch bark using water at elevated temperature and pressure. *Analytica Chimica Acta*, 716, 40– 48.
- Conforti F., Sosa S., Marrelli M., Menichini F., Statti G.A., Uzunov D., Tubaro A., Menichini F., Della Loggia R. (2008). *In vivo* anti-inflammatory and *in vitro* antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 116, 144-151.
- Costa S.S., Garipey Y., Rocha S.C.S., Raghavan V. (2014). Microwave extraction of mint essential oil - Temperature calibration for the oven. *Journal of Food Engineering*, 126, 1-6.
- Da Porto C., Decorti D. (2009). Ultrasound-assisted extraction coupled with under vacuum distillation of flavor compounds from spearmint (carvone-rich) plants: Comparison with conventional hydrodistillation. *Ultrasonic Sonochemistry*, 16, 795-799.
- Dai J., Orsat V., Raghavan G.S.V., Yaylayan V. (2010). Investigation of various factors for the extraction of peppermint (*Mentha piperita* L.) leaves. *Journal of Food Engineering*, 96, 540–543.
- Danielson N.D., Gallagher P.A., Bao J.J. (2000). Chemical Reagents and Derivatization Procedures in Drug Analysis. En: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. R.A. Meyers, Chichester, UK.

- Dawidowicz A.L., Rado E. (2010). Matrix solid-phase dispersion (MSPD) in chromatographic analysis of essential oils in herbs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 52, 79–85.
- Deng S.G., Hu X.J., Li W.Y. (2008). Preliminary studies on the instability of volatile oil in *Rhizoma atractylodis* with different antiinflammation effects. *Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine*, 35, 1733-1734
- Díaz S. (1998). Comportamiento del follaje de *Pinus caribaea* var. *caribaea* y *Pinus tropicalis* en el desarrollo de una metodología para la obtención de cera conífera, pasta clorofilacaroteno y residuo forrajero a escala de banco. Tesis doctoral, Universidad de Pinar del Río, Cuba.
- Diouf P.N., Stevanovic T., Boutin Y. (2009). The effect of extraction process on polyphenol content, triterpene composition and bioactivity of yellow birch (*Betula alleghaniensis* Britton) extracts. *Industrial Crops & Products*, 30, 297–303.
- Dobiáš P., Pavlíková P., Adam M., Eisner A., Beňová B., Ventura K. (2010). Comparison of pressurised fluid and ultrasonic extraction methods for analysis of plant antioxidants and their antioxidant capacity. *Central European Journal of Chemistry*, 8, 87-95.
- Dolatowski Z.J., Stasiak D.M. (2011). Ultrasonically assisted diffusion processes. En: *Enhancing Extraction processes in the Food industry*. Lebovka N, Vorobiev E, Chemat F. CRC Press, Dublin, Irlanda.
- Dos Santos Pereira A., de Aquino Neto F.R. (1999). High-temperature high-resolution gas chromatography: breaching the barrier to the analysis of polar and high molecular weight compounds. *Trends in Analytical Chemistry*, 18, 76-126.
- Ekka N.R., Namdeo K.P., Samal P.K. (2008). Standardization strategies for herbal drugs-an overview. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 1, 310-312.
- Elings S., Lempers H.E.B., Sheldon R.A. (2000). Solid-acid catalysed rearrangement of cyclic α,β -epoxy ketones. *European Journal of Organic Chemistry*, 10, 1905-1911.
- El-Kashoury E.S.A., El-Askary H.I., Kandil Z.A., Ezzat S.M., Salem M.A., Sleem A.A. (2014). Chemical and biological study of *Mentha suaveolens* Ehrh. cultivated in Egypt. *Journal of Medicinal Plants Research*, 8, 747-755.

- El-Sayed S.A.H., Salman M.S., Fadl M.A., Elkhateeb A., Elawady M. (2018). Chemical composition of hydrodistillation and solvent free microwave extraction of essential oils from *Mentha piperita* L. growing in Taif, Kingdom of Saudi Arabia, and their anticancer and antimicrobial activity. *Oriental Journal of Chemistry*, 34, 222-233.
- Eskilsson C.S., Björklund E. (2000). Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 902, 227-250.
- European Commission Concerted Action on Functional Food Science in Europe (FOFUSE). (1999). *British Journal of Nutrition*, 81, 1-27.
- Fernández-Bolaños J., Rodríguez G., Rodríguez R., Guillén R., Jiménez A. (2006). Potential use of olive by-products. Extraction of interesting organic compounds from olive oil waste. *Grasas y Aceites*, 57, 95-106.
- Ferreira R., García H., Sousa A.F., Freire C., Silvestre A., Kunz W., Rebelo L.P.N., Silva Pereira C. (2013a). Microwave assisted extraction of betulin from birch outer bark. *Royal Society of Chemistry Advances*, 3, 21285–21288.
- Ferreira R., García H., Sousa A.F., Freire C.S.R., Silvestre A., Rebelo L.P.N., Silva Pereira C. (2013b). Isolation of suberin from birch outer bark and cork using ionic liquids: A new source of macromonomers. *Industrial Crops & Products*, 44, 520– 527.
- Ferreira-Montero J., Luengo-Fernández E. (2007). La dieta como concepto terapéutico. Conceptos de alimento funcional y de nutraceutico. Situación actual de los alimentos funcionales y nutraceuticos. En: Alimentos funcionales y nutraceuticos. Luengo-Fernández E. Sociedad Española de Cardiología, Acción Médica, España.
- Freysdottir J., Sigurpalsson M.B., Omarsdottir S., Olafsdottir E.S., Vikingsson A., Hardardottir I. (2011). Ethanol extract from birch bark (*Betula pubescens*) suppresses human dendritic cell mediated Th1 responses and directs it towards a Th17 regulatory response *in vitro*. *Immunology Letters*, 136, 90-96.
- Gallo M.B.C., Sarachine M.J. (2009). Biological activities of lupeol. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 3, 46–66.
- Gámiz-García L., Luque de Castro M.D. (2000). Continuous subcritical water extraction of medicinal plant essential oil: comparison with conventional techniques. *Talanta*, 51, 1179-1185.

- Gao Y., Nagy B., Liu X., Simandi B., Wang O. (2009). Supercritical CO₂ extraction of lutein esters from marigold (*Tagetes erecta* L.) enhanced by ultrasound. *Journal of Supercritical Fluids*, 49, 345-350.
- Garavand F., Rahae S., Vahedikia N., Jafari S.M. (2019). Different techniques for extraction and micro/nanoencapsulation of saffron bioactive ingredients. *Trends in Food Science and Technology*, 89, 26-44.
- García-Pérez M.E., Diouf P.N., Tatjana S. (2008). Comparative study of antioxidant capacity of yellow birch twigs extracts at ambient and high temperatures. *Food Chemistry*, 107, 344–351.
- Gavahian M., Farahnaky A., Farhoosh R., Javidnia K., Shahidi F. (2015). Extraction of essential oils from *Mentha piperita* using advanced techniques: Microwave versus ohmic assisted hydrodistillation. *Food and Bioproducts Processing*, 94, 50-58.
- Ghoulami S., Idrissi A.I., Fkih-Tetouani S. (2001). Synthèse de nouveaux hétérocycles à partir de l'oxyde de pipériténone. *Tetrahedron Letters*, 42, 2107-2109.
- Gil-Chávez G.J., Villa J.A., Ayala-Zavala J.F., Heredia J.B, Sepulveda D., Elhadi M., Yahia E.M., González-Aguilar G.A. (2013). Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: An overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12, 5-21.
- Granado-Serrano A.B., Martín M.A., Izquierdo-Pulido M., Goya, Bravo L., Ramos S. (2007). Molecular mechanisms of (-)-epicatechin and chlorogenic acid on the regulation of the apoptotic and survival/proliferation pathways in a human hepatoma cell line. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 2020–2027.
- Gu L.B, Zhang G.J., Du L., Qi K., Zhu X.L, Zhang X.Y., Jiang Z.H. (2019). Comparative study on the extraction of *Xanthoceras sorbifolia* Bunge (yellow horn) seed oil using subcritical *n*-butane, supercritical CO₂, and the Soxhlet method. *LTW-Food Science and Technology*, 111, 548-554.
- Gulluce M., Sahin F., Sokmen M., Ozer H., Daferera D., Sokmen A., Polissiou M., Adiguzel A., Ozkan H. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. *Food Chemistry*, 103, 1449-1456.

- Guo X., Shang X.F., Zhou X.Z., Zhao B.T., Zhang J.Y. (2017). Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from *Rhododendron aganniphym*: Antioxidant activity and rheological properties. *Ultrasonics Sonochemistry*, 38, 246-255.
- Hao J., Han W., Huang S., Xue B., Deng X. (2002). Microwave-assisted extraction of artemisinin from *Artemisia annua* L. *Separation and Purification Technology*, 28, 191-196.
- Hao Y.J., Sang Y.L., Li B.L., Jia T.Z. (2007). Evaluation of stability of atractylone at ambient temperature. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 29, 895-896.
- Henry M.C., Yonker, C.R. (2006). Supercritical fluid chromatography, pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction. *Analytical Chemistry*, 78, 3909-3916.
- Herrero M., Martín-Álvarez P., Señoráns F.J., Cifuentes A., Ibáñez E. (2005). Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. *Food Chemistry*, 93, 417-423.
- Hiltunen E., Pakkanen T.T., Alvila L (2006). Phenolic compounds in silver birch (*Betula pendula* Roth) wood. *Holzforschung*, 60, 519-527.
- Hossain M., Rai D., Brunton N., Martin-Diana A.B., Barry-Ryan C. (2010). Characterization of phenolics composition in lamiaceae spices by LC-ESI-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 10576-10581.
- Huh J.E., Baek Y.H., Kim Y.J., Lee J.D., Choi D.Y., Park D.S. (2009). Protective effects of butanol fraction from *Betula platyphylla* var. japonica on cartilage alterations in a rabbit collagenase-induced osteoarthritis. *Journal of Ethnopharmacology*, 25, 515-521.
- Huh J.E., Hong J.M, Baek Y.H., Lee D.J., Choi D.Y., Park D.S. (2011). Anti-inflammatory and anti-nociceptive effect of *Betula platyphylla* var. japonica in human interleukin-1-stimulated fibroblast-like synoviocytes and in experimental animal models. *Journal of Ethnopharmacology*, 135, 126-134.
- Ibáñez E., Cifuentes A. (2001). New analytical techniques in food science. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 41, 413-450.

- İşcan G., Kirimer N., Kürkcüoğlu M., Can Başer H., Demirci F. (2002). Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3943-3946.
- Jäger A. K., Almqvist J. P., Vangsoe S. A. K., Stafford G. I., Adsersen A., Van Staden J. (2007). Compounds from *Mentha aquatic* with affinity to the GABA-benzodiazepine receptor. *South African Journal of Botany*, 73, 518-521.
- Jäger S., Laszyk M.N., Scheffler A (2008). A Preliminary Pharmacokinetic Study of Betulin, the Main Pentacyclic Triterpene from Extract of Outer Bark of Birch (*Betula alba* cortex). *Molecules*, 13, 3224-3235.
- Jäger S., Trojan H., Kopp T., Laszczyk M.N., Scheffler A (2009). Pentacyclic triterpene distribution in various plants - rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. *Molecules*, 14, 2016-2031.
- Jiménez A., Beltrán G., Uceda, M. (2007). High-power ultrasound in olive paste pretreatment. Effect on process yield and virgin olive oil characteristics. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14, 725-731.
- Kalili K.M., de Villiers, A. (2013). Systematic optimization and evaluation of on-line, off-line and stop-flow comprehensive hydrophilic interaction chromatography x reversed phase liquid chromatographic analysis of procyanidins. Part II: application to cocoa procyanidins. *Journal of Chromatography A*, 1289, 69-79.
- Kamkar A., Javan A.J., Asadi F., Kamalinejad M. (2010). The antioxidative effect of Iranian *Mentha pulegium* extracts and essential oil in sunflower oil. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 1796–1800.
- Kedia A., Prakash B., Kumar Mishra P., Chanotiya C.S., Kishore Dubey N. (2014). Antifungal, antiaflatoxigenic, and insecticidal efficacy of spearmint (*Mentha spicata* L.) essential oil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 89, 29-36.
- Khan M.K., Abert-Vian M., Fabiano-Tixier A.S., Dangles O., Chemat, F. (2010). Ultrasound assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*, 2, 851-858.
- Kimbaris A.C., González-Coloma A., Andrés M.F., Vidali V.P., Plissiou M.G., Santana-Méridas O. (2017). Biocidal compounds from *Mentha* sp. essential oils and their structure-activity relationships. *Chemistry & Biodiversity*, 14, 1-10.

- Knapp D.R. (1979). Handbook of Analytical Derivatization Reactions, 1^a ed. Wiley Interscience, New York, USA
- Koptelova E.N., Kutakova, N.A., Tretyakov S.I. (2014). Isolation of the extractives and betulin from birch bark exposed to a microwave field. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 40, 791-795.
- Kosar M., Dorman H.J.D., Baser K.H.C., Hiltunen R. (2004). Screening of free radical scavenging compounds in water extracts of *Mentha* samples using a postcolumn derivatization method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5004- 5010.
- Krasutsky P.A. (2006). Birch bark research and development. *Natural Products Reports*, 23, 919–942.
- Król S.K, Kielbus M., Rivero-Müller A., Stepulak A. (2014). Comprehensive review on betulin as a potent anticancer agent. *Biomed Research International*, 1-11.
- Krzyzanowska J., Janda B., Pecio L., Stochmal A., Oleszek W., Czubacka A., Przybys M., Doroszewska T. (2011). Determination of polyphenols in *Mentha longifolia* and *M. piperita* field-grown and *in vitro* plant samples using UPLC-TQ-MS. *Journal of AOAC International*, 94, 43-50.
- Kumar P., Mishra S., Malik A., Satya, S. (2011). Insecticidal properties of *Mentha* species: A review. *Industrial Crops & Products*, 34, 802-817.
- Kwon J.H., Bélanger J.M., Paré J.R. (2003). Optimization of microwave-assisted extraction (MAP) for ginseng components by response surface methodology. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 51, 1807-1810.
- Lao S.C, Li S.P., Kan K.K.W., Li P., Wan J.B., Wang Y.T., Dong T.T.X., Tsim K.W.K. (2004). Identification and quantification of 13 components in *Angelica sinensis* (Danggui) by gas chromatography mass spectrometry coupled with pressurized liquid extraction. *Analytical Chimica Acta*, 526, 131-137.
- Laszczyk M., Jäger S., Simon-Haarhaus B., Scheffler A., Schempp C.M. (2006). Physical, chemical and pharmacological characterization of a new oleogel-forming triterpene extract from the outer bark of birch (*Betulae cortex*). *Planta Medica* 72, 1389-1395.

- Lavoie J.M., Stevanovic T. (2005). Variation of chemical composition of the lipophilic extracts from yellow birch (*Betula alleghaniensis*) foliage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4747–4756.
- Lavoie J.M., Stevanovic T. (2006). Yield and composition of lipophilic extracts of yellow birch (*Betula alleghaniensis* Britton) as a function of wood age and aging under industrial conditions. *Holzforschung*, 60, 184–189.
- Lavoie J.M., Stevanovic T. (2007). Selective ultrasound-assisted extractions of lipophilic constituents from *Betula alleghaniensis* and *B. papyrifera* wood at low temperatures. *Phytochemical Analysis*, 18, 291–299.
- Lebrón-Aguilar R., Soria A.C., Quintanilla-López J.E. (2016). Comprehensive evaluation of direct mass spectrometry for the quantitative profiling of volatiles in food samples. *Philosophical Transactions of The Royal Society*, 374 (2079), 1-14.
- Leyva-Jiménez J. F, Lozano-Sanchez J., Borrás-Linares I. (2018). Comparative study of conventional and pressurized liquid extraction for recovering bioactive compounds from *Lippia citriodora* leaves. *Food Research International*, 109, 213-222.
- Lin L., Zhuang M., Lei F., Yang B., Zhao M. (2013). GC/MS analysis of volatiles obtained by headspace solid-phase microextraction and simultaneous–distillation extraction from *Rabdosia serra* (MAXIM.) HARA leaf and stem. *Food Chemistry*, 136, 555-562.
- Lin T., Liu Y., Lai C., Yang T., Xie J., Zhang Y. (2018). The effect of ultrasound assisted extraction on structural composition, antioxidant activity and immunoregulation of polysaccharides from *Ziziphus jujuba* Mill var. *spinosa* seeds. *Industrial Crops & Products*, 125, 150-159.
- Liu J., Chen P., Yao W., Wang J., Wang L., Deng L., He J., Zhang G., Lei J. (2015). Subcritical water extraction of betulinic acid from birch bark. *Industrial Crops & Products*, 74, 557–565.
- López V., Martín S., Gómez-Serranillos P., Carretero E., Jager A.K., Calvo I. (2010). Neuroprotective and neurochemical properties of mint extracts. *Phytotherapy Research*, 24, 869-874.

- López-Ávila V., Young R., Becker W.F. (1994). Microwave-assisted extraction of organic compounds from standard reference soils and sediments. *Analytical Chemistry*, 66, 1097-1106.
- López-Ávila V., Young R., Benedicto J., Ho P., Becker W.F. (1995). Extraction of organic pollutants from solid samples using microwave energy. *Analytical Chemistry*, 67, 2096-2102.
- Lorenzo D., Paz D., Dellacassa E., Davies P., Vila R., Cañigüeral S. (2002). Essential oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45, 519-524.
- Lorenzo R.A., Vázquez M.J., Carro A.M., Cela R. (1999). Methylmercury extraction from aquatic sediments. A comparison between manual, supercritical fluid and microwave-assisted techniques. *Trends in Analytical Chemistry*, 18, 410-416.
- Luque de Castro M.D., Priego-Capote F. (2011). Microwave-assisted extraction. En: Enhancing extraction processes in the food industry. N. Lebovka, E. Vorobiev, F. Chemat. CRC Press, Dublin, Irlanda.
- Machado A.P.D., Perira A.L.D., Barbero G.F., Martinez, J. (2017). Recovery of anthocyanins from residues of *Rubus fruticosus*, *Vaccinium myrtillus* and *Eugenia brasiliensis* by ultrasound assisted extraction, pressurized liquid extraction and their combination. *Food chemistry*, 231, 1-10.
- Mahboubi M., Haghi G. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *Journal of Ethnopharmacology*, 119, 325-327.
- Mämmelä P. (2001). Phenolics in selected European hardwood species by liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry. *Analyst*, 126, 1535-1538
- Martín-Ortiz A., Ruiz-Matute A.I., Sanz M.L., Moreno F.J, Herrero M. (2019). Separation of di-and trisaccharide mixtures by comprehensive two dimensional liquid chromatography. Application to prebiotic oligosaccharides. *Analytica Chimica Acta*, 1060, 125-132.
- Mason T.J., Lorimer J.P. (2002). Applied sonochemistry. The uses of power ultrasound in Chemistry and Processing. Weinheim: Wiley-VCH, Coventry, UK

- Matsuoka K., Nakazawa T., Nakamura A., Honda C., Endo K., Tsukada M. (2008). Study of thermodynamic parameters for solubilization of plant sterol and stanol in bile salt micelles. *Chemistry and Physics of Lipids*, 154, 87–93.
- McLafferty F. W., Stauffe D. B. (1989). *The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data*, Wiley, New York, USA.
- Mendiola J.A., Herrero M., Cifuentes A. (2007). Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications. *Journal of Chromatography A*, 1152, 234-246.
- Miguel M., Barros L., Pereira C., Calhella R.C., García P.A., Castro M.A., Santos-Buelga C., Ferreira I.C.F.R. (2016). Chemical characterization and bioactive properties of two aromatic plants: *Calendula officinalis* L. (flowers) and *Mentha cervina* L. (leaves). *Food & Function*, 7, 2223-2232.
- Miller D.J., Hawthorne S.B. (2000). Solubility of liquid organic flavor and fragrance compounds in subcritical (hot/liquid) water from 298 K to 473 K. *Journal of chemical & engineering data*, 45, 315-318.
- Misan A.C., Mimica-Dukic N.M., Mandic A.I., Sakac M.B., Milovanovic I.L., Sedej I.J. (2011). Development of a rapid resolution HPLC method for the separation and determination of 17 phenolic compounds in crude plant extracts. *Central European Journal of Chemistry*, 9 (1), 133-142.
- Moldovan R.I., Oprean R., Benedec D., Hanganu D., Duma M., Oniga I., Vlase L. (2014). LC-MS analysis, antioxidant and antimicrobial activities for five species of *Mentha* cultivated in Romania. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 9, 559-566.
- Montero C.M., Dodero M.C.R., Sánchez D.A.G., Barroso C.G. (2004). Analysis of low molecular weight carbohydrates in food and beverages: A review. *Chromatographia*, 59, 15-30.
- Moon J., Shibamoto T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1655-1666.
- Moreira M., Barroso M.F., Boeykens A., Withouck H., Morais S., Delerue-Matos C. (2017). Valorization of apple tree wood residues by polyphenols extraction: Comparison between conventional and microwave-assisted extraction. *Industrial Crops & Products*, 104, 210–220.

- Mulet A., Benedito J., Bon J., San Juan N. (1999). Review: Low intensity ultrasonics in food technology. *Food Science and Technology International*, 5, 285-297.
- Mulet A., Carcel J.A., San Juan N. (2003). New food drying technologies - Use of ultrasound. *Food Science and Technology International*, 9, 215-221.
- Muñoz-Almagro N., Valadez-Carmona L., Mendiola J.A., Ibáñez E., Villamiel M. (2019). Structural characterization of pectin obtained from cacao pod husk. Comparison of conventional and subcritical water extraction. *Carbohydrate Polymers*, 217, 69–78.
- Nabet N., Gilbert-López B., Madani K., Herrero M., Ibáñez E., Mendiola J.A. (2019). Optimization of microwave-assisted extraction recovery of bioactive compounds from *Origanum glandulosum* and *Thymus fontanesii*. *Industrial Crops & Products*, 129, 395-404.
- Nejati-Yazdinejad M., Soozangar, A. (2013). HPLC method for evaluation of antioxidant activity of *Mentha pulegium* leaves extract. *Research Journal of Chemistry and Environment*, 17, 22-26.
- Olsen H.T., Stafford G.I., van Staden J., Christensen S.B., Jäger, A.K. (2008). Isolation of the MAO-inhibitor naringenin from *Mentha aquatica* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 117, 500-502.
- Palá-Paúl J., Usano-Aleman J., Granda E., Soria A.C. (2012). Antifungal and antibacterial activity of the essential oil of *Chamaecyparis lawsoniana* from Spain. *Natural Product Communications*, 7, 1383-1386.
- Panteghini M., Bonora R., Pagani F. (2001). Measurement of pancreatic lipase activity in serum by a kinetic colorimetric assay using a new chromogenic substrate. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine*, 8, 365-370.
- Papageorgiu V., Mallouchos A., Komaitis M. (2008). Investigation of the antioxidant behavior of air-and freeze-dried aromatic plant materials in relation to their phenolic content and vegetative cycle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5743-5752.
- Patonay K., Korós M., Murányi Z., Péntzesné-Lónya E. (2017). Polyphenols in northern Hungarian *Mentha longifolia* (L.) L. treated with ultrasonic extraction for potential oenological uses. *Journal of Agriculture and Forestry*, 41, 208-217.

- Pereira O.R., Cardoso S. (2013). Overview on Mentha and Thymus polyphenols. *Current Analytical Chemistry*, 9, 382-396.
- Pisha E., Chai H., Lee I.S., Chagwedera T.E., Farnsworth N.R., Cordell G.A., Beecher, C.W.W., Fong H.H.S., Kinghorn A.D., Brown D.M., Wani M.C., Wall M.E., Hieken T.J., Das Gupta T.K., Pezzuto J.M. (1995). Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nature Medicine*, 1, 1046-1051.
- Politi M., Rodrigues C.L., Gião M.S., Pintado M.E., Castro P.M.L. (2008). Antioxidant principles and volatile constituents from the north-western iberian mint “erva-peixeira”, *Mentha cervina*. *Natural product communications*, 3, 2065-2068.
- Povey M.J.W., Mason T. (1998). *Ultrasound in Food Processing*. Blackie Academic & Professional, London, UK.
- Proestos C., Sereli D., Komaitis M. (2006). Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. *Food chemistry*, 95, 44-52.
- Proestos C., Chorianopoulos N., Nychas J.E., Komaitis M. (2005). RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1190-1195.
- Qi-he C., Ming-Liang F., Jin L., Hai-feng Z., Guo-qing H., Hui R. (2009). Optimization of ultrasonic-assisted extraction (UAE) of betulin from white birch bark using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16, 599–604.
- Ramos L., Kristenson E.M., Brinkman U.A.T. (2002). Current use of pressurised liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. *Journal of Chromatography A*, 975, 3-29.
- Rastogi S., Pandey M.M., Kumar A., Rawat W. (2015). Medicinal plants of the genus Betula- Traditional uses and a phytochemical-pharmacological review. *Journal of Ethnopharmacology*, 159, 62-83.
- Reitsema R.H. (1956). A new ketone from oil of *Mentha rotundifolia*. *Journal of the American Chemical Society*, 78, 5022-5025.

- Ressmann A.K., Strassl K., Gaertner P., Zhao B., Greiner L., Bica K. (2012). New aspects for biomass processing with ionic liquids: towards the isolation of pharmaceutically active betulin. *Green Chemistry*, 14, 940-944.
- Riahi L., Elferchichi M., Ghazghazi H., Jebali J., Ziadi S., Aouadhi C., Chograni H., Zaouali Y., Zoghlami N., Mliki A. (2013). Phytochemistry, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils of *Mentha rotundifolia* L. in Tunisia. *Industrial Crops & Products*, 49, 883-889.
- Richter B.E., Jones B.A., Ezzell J.L., Porter N.L., Avdalovic N., Pohl C. (1996). Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation. *Analytical Chemistry*, 68, 1033-1039.
- Rigano F., Caccionla F., Schure M., Farnetti S., Russo M., Dugo P., Mondello L. (2016). Comprehensive two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of wine polyphenols and target contaminants. *Journal of Chromatography A*, 145, 54-62.
- Ríos J.L, Máñez S. (2018). New pharmacological opportunities for betulinic acid. *Planta Medica*, 84, 8-19.
- Rita I., Pereira C., Barros L., Santos-Buelga C., Ferreira I.C. (2016). *Mentha spicata* L. infusions as sources of antioxidant phenolic compounds: emerging reserve lots with special harvest requirements. *Food & Function*, 7, 4188-4192.
- Rivellino S.R., Wang Hantao L., Risticovic S., Carasek E., Pawliszyn J., Augusto F. (2013). Detection of extraction artifacts in the analysis of honey volatiles using comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Food Chemistry*, 141, 1828-1833.
- Rodríguez-Meizoso I., Marín F.R., Herrero M., Señoráns F.J., Reglero G., Cifuentes A., Ibáñez E. (2006). Subcritical water extraction of nutraceuticals from oregano. Chemical and functional characterization. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1560-1565.
- Rodríguez-Sánchez S., García-Sarrió M.J., Quintanilla-López J.E., Soria A.C., Sanz, M.L. (2015). Analysis of iminosugars and other low molecular weight carbohydrates in *Aglaonema* sp. extracts by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1423, 104-10.

- Rodríguez-Sánchez S., Martín-Ortiz A., Carrero-Carralero C., Ramos S., Sanz M.L., Soria A.C. (2016). Pressurized liquid extraction of *Aglaonema* sp. iminosugars: Chemical composition, bioactivity, cell viability and thermal stability. *Food Chemistry*, 204, 62–69.
- Rodríguez-Sánchez S., Ruiz-Aceituno L., Sanz M.L., Soria A.C. (2013). New methodologies for the extraction and fractionation of bioactive carbohydrates from mulberry (*Morus alba*) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 4539-4545.
- Rodríguez-Sánchez S., Hernández-Hernández O., Ruiz-Matute A.I., Sanz M.L. (2011). A derivatization procedure for the simultaneous analysis of iminosugars and other low molecular weight carbohydrates by GC-MS in mulberry (*Morus* sp.). *Food Chemistry*, 126, 356-359.
- Rodríguez-Sánchez S., Galindo-Iranzo P., Soria A.C., Sanz M.L., Quintanilla-López J.E., Lebrón-Aguilar R. (2014). Characterization by the solvation parameter model of the retention properties of commercial ionic liquid columns for gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1326, 96-102.
- Rodríguez-Solana R., Salgado J.M., Domínguez J.M., Cortés-Diéguez S. (2014). Comparison of Soxhlet, accelerated solvent and supercritical fluid extraction techniques for volatile (GC–MS and GC/FID) and phenolic compounds (HPLC–ESI/MS/MS) from Lamiaceae Species. *Phytochemical Analysis*, 26, 61–71.
- Ros M., Escobar-Arnanz J., Sanz M.L., Ramos L. (2018). Evaluation of ionic liquid gas chromatography stationary phases for the separation of polychlorinated biphenyls. *Journal of Chromatography A*, 1559, 156-163.
- Ruiz del Castillo M.L., Blanch G. P., Herraiz M. (2004). Natural variability of the enantiomeric composition of bioactive chiral terpenes in *Mentha piperita*. *Journal of Chromatography A*, 1054, 87-93.
- Ruiz-Aceituno L., Rodríguez-Sánchez S., Ruiz-Matute A.I., Ramos L., Soria A.C., Sanz M.L. (2013). Optimization of a biotechnological procedure for selective fractionation of bioactive inositols in edible legume extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 2797-2803.
- Ruiz-Aceituno L., García-Sarrió M.J., Alonso-Rodríguez B., Ramos L., Sanz M.L. (2016). Extraction of bioactive carbohydrates from artichoke (*Cynara scolymus* L.) external

- bracts using microwave assisted extraction and pressurized liquid extraction. *Food Chemistry*, 196, 1156–1162.
- Saeed S., Tariq P. (2005). Antibacterial activities of *Mentha piperita*, *Pisum sativum* and *Momordica charantia*. *Pakistan Journal of Botany*, 37, 997-1001.
- Sajid M., Nazal M.K., Rutkowska M., Szczepanska N., Namiesnik J., Plotka-Wasyłka J. (2019). Solid phase microextraction: apparatus, sorbent materials and application. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 49, 271-288.
- Sami A., Taru M., Salme K., Jari Y.K. (2006). Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29, 1–13.
- Sampaio-Cutrim C., Sloboda-Cortez M.A. (2018). A review on polyphenols: Classification, beneficial effects and their application in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 71, 564-578.
- Santoyo S., Cavero S., Jaime L. (2006). Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with antimicrobial activity from *Origanum vulgare* L.: Determination of optimal extraction parameters. *Journal of Food Protection*, 69, 369-375.
- Sanz M.L., Sanz J., Martínez-Castro I. (2002). Characterization of *O*-trimethylsilyl oximes of disaccharides by gas chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia*, 56, 617-622.
- Sanz M.L., Martínez-Castro I. (2007). Recent developments in simple preparation for chromatographic analysis of carbohydrates. *Journal of Chromatography A*, 1153, 74-89.
- Sasidharan S., Chen Y., Saravanan D., Sundram K.M, Latha L.Y. (2011). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines*, 8, 1-10.
- Scalbert A., Johnson I.T., Saltmarsh M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 215S-217S.
- Scherer R., Fumiere Lemos M., Fumiere Lemos M., Coimbra Martinelli G., Lopes Martins, J. D., Gomes da Silva A. (2013). Antioxidant and antibacterial activities and composition of Brazilian spearmint (*Mentha spicata* L.). *Industrial Crops & Products*, 50, 408-413.

- Seyedan A., Alshawh M.A., Alshagga M.A., Koosha S., Mohamed Z. (2015). Medicinal plants and their inhibitory activities against pancreatic lipase: A review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-13
- Shahidi F., Zhong Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757-781.
- Shikov A.N., Djachuk G.I., Sergeev D.V., Pozharitskaya O.N., Esaulenko E.V., Kosman V.M., Makarov V.G. (2011). Birch bark extract as therapy for chronic hepatitis C - A pilot study. *Phytomedicine*, 18, 807-810
- Shirsath S.R., Sable S.S., Gaikwad S.G., Sonawane S.H., Saini D.R., Gogate P.R. (2017). Intensification of extraction of curcumin from *Curcuma amada* using ultrasound assisted approach: Effect of different operating parameters. *Ultrasonics Sonochemistry*, 38, 437-445.
- Shukla S., Gupta S. (2010). Apigenin: a promising molecule for cancer prevention. *Pharmaceutical Research*, 27, 962-978.
- Silva-Weiss A., Ihl M., Sobral P.J.A., Gómez-Guillén M.C., Bifani V. (2013). Natural additives in bioactive edible films and coatings: functionality and applications in foods. *Food Engineering Reviews*, 5, 200-216.
- Singh S., Das S.S., Singh G., Perotti M., Schuff C., Catalan C., Atilio N. (2015). *In vitro* antioxidant potentials and chemistry of essential oils and oleoresins from fresh and sun-dried *Mentha longifolia* L. *Journal of Essential Oil Research*, 27, 61-69.
- Singleton V.L., Orthofer F., Lamuela-Raventós R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Slanc P., Doljak B., Kreft S., Lunder M., Janes D., Strukelj B. (2009). Screening of selected food and medicinal plant extracts for pancreatic lipase inhibition. *Phytotherapy Research*, 23, 874-877.
- Smith R.M. (2002). Extraction with superheated water. *Journal of Chromatography A*, 975, 31-46.

- Soria A.C., Corzo-Martínez M., Montilla A., Riera E., Gamboa-Santos J., Villamiel M. (2010a). Chemical and physicochemical quality parameters in carrots dehydrated by power ultrasound. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 7715-7722.
- Soria A.C., Rodríguez-Sánchez S., Sanz M.L., Sanz J., Martínez-Castro I. (2010b). Characterization of birch extracts by chromatographic and mass spectrometric techniques. Poster en 28th International Symposium on Chromatography and Related Techniques (Valencia)
- Soria A.C., Ruiz-Aceituno L., Ramos L., Sanz M.L. (2015). Microwave Assited Extraction of Polysaccharides. En: Polysaccharides: Bioactivity and biotechnology. Ramawat K.G. y Mérillon J.M., Springer.
- Soria A.C., Villamiel M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review . *Trends in food Science and Technology*, 21 (7) 323-331.
- Soria A.C., Corzo-Martínez M., Montilla A., Riera E., Gamboa-Santos J., Villamiel M. (2010). Chemical and physicochemical quality parameters in carrots dehydrated by power ultrasound. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 7715–7722.
- Soria A.C., García-Sarrió M.J., Sanz, M.L. (2015). Volatile sampling by headspace techniques. *Trends in Analytical Chemistry*, 71, 85-99.
- Souza-Silva E.A., Giofriddo E., Pawliszyn J. (2015). A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices II. Food analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 71, 236-248.
- Souza-Silva E.A., Risticovic S., Pawliszyn J. (2013). Recent trends in SPME concerning sorbent materials, configuration and *in vivo* applications. *Trends in Analytical Chemistry*, 43, 24-36.
- Sparr C., Bjöklund, E. (2000). Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 902, 227-250.
- Stagos D., Portesis N., Spanou C., Mossialos D., Aligiannis N., Chaita E., Panagoulis C., Reri E., Skaltsounis L., Tsatsakis A.M. (2012). Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 4115-4124.

- St-Pierre F., Achim A., Stevanovic T. (2013). Composition of ethanolic extracts of wood and bark from *Acer saccharum* and *Betula alleghaniensis* trees of different vigor classes. *Industrial Crops & Products*, 41, 179–187.
- Sun D.W. (2006). *Emerging Technologies for Food Processing*. Elsevier Academic Press, London, UK.
- Suslick K.S. (1998). Sonochemistry. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. Fourth Edition. John Wiley & Sons, New York, USA.
- Syahriza Z.A., Torkamani A.E., Norziah H.M., Mahmood W.A.K., Juliano P. (2016). Optimisation of pressurised liquid extraction for antioxidative polyphenolic compound from *Momordica charantia* using response surface methodology. *International Journal of Food Science and Technology*, 52, 480-493.
- Taamalli A., Arráez-Román D., Abaza L., Iswaldi I., Fernández-Gutiérrez A., Zarrouk M., Segura-Carretero A. (2015). LC-MS-based metabolite profiling of methanolic extracts from the medicinal and aromatic species *Mentha pulegium* and *Origanum majorana*. *Phytochemical Analysis*, 26, 320-330.
- Tavares G.R., Massa T.B., Goncalves J.E., da Silva C., Do Santos W.D. (2017). Assessment of ultrasound-assisted extraction of crambe seed oil for biodiesel synthesis by in situ interesterification. *Renewable Energy*, 111, 659-665.
- Thach L.N., Nhung T.H., My V.T.N., Tran H.A. (2013). The new rich source of rotundifolone: *Mentha aquatica* Linn. var. *crispa* oil from microwave-assisted hydrodistillation. *Journal of Essential Oil Research*, 25, 39-43.
- Tine Y., Yang Y., Renucci F., Costa J., Wele A., Paolini J. (2017). LC-MS/MS analysis of flavonoid compounds from *Zanthoxylum zanthoxyloides* extracts and their antioxidant activities. *Natural product communications*, 12, 1865-1868.
- Tolstikov G.A., Flkhter O.B., Shultz E.E., Baltina L.A., Tolstikov A.G. (2005). Betulin and its derivatives. Chemistry and biological activity. *Chemistry for Sustainable Development*, 13, 1-29.
- Tschiggerl C., Bucar F. (2010). Investigation of the volatile fraction of rosemary infusion extracts. *Scientia Pharmaceutica*, 78, 483–492.

- Tucci S.A., Boyland E.J., Halford J.C.G. (2010). The role of lipid and carbohydrate digestive enzyme inhibitors in the management of obesity: a review of current and emerging therapeutic agents. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 3, 125–143.
- Vainiotalo P., Julkunen-Tiitto R., Juntheikki M.R., Reichardt P., Auriola S. (1991). Chemical characteristics of herbivore defenses in *Betula pendula* winter-dormant young stems. *Journal of Chromatography*, 547, 367-376.
- Vázquez M.J., Carro A.M., Lorenzo R.A., Cela R. (1997). Optimization of methylmercury microwave-assisted extraction from aquatic sediments. *Analitical Chemistry*, 69, 221-225.
- Vergara-Salinas J.R., Pérez-Jiménez J., Torres J.L., Agosin E., Pérez-Correa J.R. (2012). Effects of temperature and time on polyphenolic content and antioxidant activity in the pressurized hot water extraction of deodorized thyme (*Thymus vulgaris*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 10920-10929.
- Vicente G., Molina S., González-Vallinas M., García-Risco M.R., Fornari T., Reglero G., Ramírez de Molina A. (2013). Supercritical rosemary extracts, their antioxidant activity and effect on hepatic tumor progression. *Journal of Supercritical Fluids*, 79, 101-108.
- Vidal A., Benítez J.Y., Rodríguez J., Carlos R., Gra H. (2003). Estimation of crown biomass for standing trees of *Pinus caribaea* var. *Caribaea*. in the forest integrated enterprise “La Palma” in the Pinar del Río province, Cuba. *Quebracho*, 11, 60-66.
- Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Sonochemistry*, 8, 303-313.
- Vinatoru M., Mason T.J., Calinescu I. (2017). Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *Trends in Analytical Chemistry*, 97, 159-178.
- Wal A., Rai A., Sharma G., Wal P. (2011). Biological activities of lupeol. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 2, 96–103.
- Wang L., Weller C.L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science and Technology*, 17, 300-312.

- Weldegergis B.T., de Villiers A., McNeish C., Seethapathy S., Mostafa A., Górecki T., Crouch A.M. (2011). Characterisation of volatile components of Pinotage wines using comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry (GC×GC-TOFMS). *Food Chemistry*, 129, 188-199.
- Willemsse C.M., Stander M.A., de Villiers A. (2013). Hydrophilic interaction chromatographic analysis of anthocyanins. *Journal of Chromatography A*, 1319, 127-140.
- Wilt T., Ishani A., MacDonald R., Stark G., Mulrow C., Lau J. (1999). Beta-sitosterols for benign prostatic hyperplasia. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 3, 1-20
- Xu J., Cheng G., Huang S., Qiu J., Jiang R., Zhu F., Ouyang G. (2016). Application of *in vivo* solid-phase microextraction in environmental analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 85, 26-35.
- Yi W.G., Wetzstein H.Y. (2011). Anti-tumorigenic activity of five culinary and medicinal herbs grown under greenhouse conditions and their combination effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 1849-1854.
- Yoon J.J., Lee Y.J., Kim J.S., Kang D.G., Lee H.S. (2010). Protective role of betulinic acid on TNF- α -induced cell adhesion molecules in vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 391, 96–101.
- Young J.C. (1995). Microwave-assisted extraction of the fungal metabolite ergosterol and total fatty acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2904-2910.
- Zhang B., Deng Z., Dan Ramdath D., Tang Y., Chen P.X., Liu R., Liu Q., Tsao R. (2015). Phenolic profiles of 20 Canadian lentil cultivars and their contribution to antioxidant activity and inhibitory effects on α -glucosidase and pancreatic lipase. *Food Chemistry*, 172, 862-872.
- Zhang, Z.S., Wang, L.J., Li, D., Jiao, S.S., Chen, X.D., Mao, Z.H. (2008). Ultrasound-assisted extraction of oil from flaxseed. *Separation and Purification Technology*, 62, 192-198.
- Zhao G., Yan W., Cao D. (2007). Simultaneous determination of betulin and betulinic acid in white birch bark using RP-HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43, 959-962.

Zhao J., Li R., Pawlak A., Henklewska M., Sysak A., Wen L., Yi J.E, Obminska-Mrukowicz B. (2018). Antitumor activity of betulinic acid and betulin in canine cancer cell lines. *In vivo*, 32, 1081-1088.

Zhou S., Liu L., Wang B., Xu F., Sun R. (2012). Microwave-enhanced extraction of lignin from birch in formic acid: Structural characterization and antioxidant activity study. *Process Biochemistry*, 47, 1799-1806.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Trends in Analytical Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/trac

Volatile sampling by headspace techniques

A.C. Soria^{*}, M.J. García-Sarrió, M.L. Sanz

Dpto. Análisis Instrumental y Química Ambiental, Instituto de Química Orgánica General (CSIC), Juan de la Cierva, 3, 28006 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Dynamic headspace (D-HS)
 Extraction
 Headspace (HS)
 Headspace-mass spectrometry (HS-MS)
 Multi-step headspace extraction (MHE)
 Purge and trap (P&T)
 Sampling
 Static headspace (S-HS)
 Volatile

ABSTRACT

We review the use of static headspace (S-HS) and dynamic headspace (D-HS) techniques for the extraction of volatiles from different matrices. We present fundamentals and the most relevant advances in instrumentation, together with detailed discussion on the most important parameters affecting HS sampling. We also describe some of the most recent and outstanding applications, classified according to the type of matrix – among them, the use of ionic liquids as solvents for S-HS, the coupling of D-HS to comprehensive two-dimensional gas chromatography, the development of novel miniaturized devices for D-HS sampling and increasing interest in approaches based on HS-mass spectrometry (HS-MS) for fast, unbiased sample classification. We also review multi-step strategies for accurate quantitation of volatiles in samples with noticeable matrix effects. To conclude, we show that HS sampling is a versatile, rapid, efficient, green technique for volatile extraction, free of interferences.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	85
2. Headspace (HS) techniques	86
2.1. Static headspace	86
2.1.1. Fundamentals	86
2.1.2. Instrumentation	86
2.1.3. S-HS parameters	86
2.1.4. Applications	87
2.2. Dynamic headspace	90
2.2.1. Fundamentals	90
2.2.2. Instrumentation	90
2.2.3. D-HS parameters	90
2.2.4. Applications	91
2.3. Multi-step headspace extraction (MHE)	96
2.4. HS-MS	96
3. Conclusions and future trends	97
Acknowledgements	97
References	97

1. Introduction

The analysis of volatile composition is of great interest in different fields, such as flavor and fragrance characterization, food and beverage authentication, environmental analysis, and quality control (QC) of samples of different natures. In most applications involving the analysis of real samples, complex mixtures of volatiles are

usually found at low concentrations together with other non-volatile matrix components. Therefore, their chromatographic analysis, usually carried out by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), requires a prior sampling step, in which volatiles are isolated from the matrix and, if possible, preconcentrated. Different techniques based on solvent extraction emerged in recent years for volatile sampling [1–3]. However, the undeniable advantages of headspace (HS)-based methods, in static or dynamic mode, as environment-friendly, easy to implement and versatile procedures, promoted their application in different fields. Moreover, and in line with the current trend on the development

^{*} Corresponding author. Tel.: +34 912587559; Fax: +34 915644853.
 E-mail address: acsoria@iqog.csic.es (A.C. Soria).

of fast, non-separative methodologies for sample characterization, the potential of the direct coupling HS-MS also attracted considerable attention.

In this review, we review and discuss the most significant literature on HS extraction from the period 2005–15.

2. Headspace (HS) techniques

The term “headspace” (HS) refers to the gas phase (in equilibrium or not with the matrix) above a solid or liquid sample, when this is placed in a closed container (usually a vial sealed with a septum). HS sampling is usually classified into two types: static (S-HS) or dynamic (D-HS).

2.1. Static headspace

In S-HS sampling, this system is heated for a given period of time at a set temperature, and volatiles are distributed between the sample phase and the gas phase until equilibrium is reached. A small fraction of the HS is further removed and, as it is free of non-volatile compounds, it can be directly analyzed by GC. S-HS sampling can also be carried out under non-equilibrium conditions, as long as the operating parameters are carefully set for reproducible analysis.

2.1.1. Fundamentals

As described in one of the first comprehensive references on the theory and definitions of HS by Kolb and Ettre [4], equilibrium in S-HS is characterized by the partition coefficient (K), which represents the ratio of analyte concentrations in the sample condensed phase (C_s) and the gas phase (C_g).

The phase ratio (β) is defined by the ratio of volumes of gas phase (V_g) and sample phase (V_s). The relationship between K and β to HS concentration (C_g) is shown in Equation (1), where C_o is the analyte concentration initially present in the sample:

$$C_g = \frac{C_o}{K + \beta} \quad (1)$$

In a given system and under specific conditions, K and β are constant, and C_g is proportional to C_o . In addition, peak area (A) in chromatography is proportional to analyte concentration (C_g), so the relationship shown in Equation (2) can be established. It is worth noting that a number of HS and GC parameters influence Equation (2), so analytical conditions should remain constant for reproducible analysis:

$$A \propto C_g = \frac{C_o}{K + \beta} \quad (2)$$

However, and according to basic laws of thermodynamics, K is inversely proportional to the vapor pressure of the analyte i (p_i^o), which depends on temperature, and to its mole concentration (x_i) and activity coefficient (γ_i), which depend on the nature of the compound and reflect its interaction with the sample matrix [Equation (3)], so, by decreasing K , an increase in C_g at equilibrium will be obtained, resulting in an improved HS sensitivity:

$$K \propto \frac{1}{p_i^o x_i \gamma_i} \quad (3)$$

By combining some of the equations above, and considering the response factor (RF) for the instrumental contribution to response, a new expression [Equation (4)] is generated to describe the relationship between the GC peak area and the analyte concentration in the sample (C_o), in which p_{total} is the total pressure in the vial:

$$A = \frac{(RF)C_o}{\frac{p_{total}}{p_i^o} + \beta} \quad (4)$$

2.1.2. Instrumentation

Instrumentation for S-HS is quite simple and, as mentioned above, usually involves the use of a sealed container and a heating system for temperature control of the sample vial. Sampling can be directly carried out using gas-tight syringes, but other devices based on different trapping materials and designs are also used for further concentration of volatiles in high concentration-capacity HS (HCC-HS) techniques, such as solid-phase microextraction (SPME) and single-drop microextraction (SDME). Literature concerning the use of these techniques is extensive [5–7] and is covered in other manuscripts within this Special Issue, so we mention below only some recent examples in which these techniques are compared with S-HS.

S-HS can be carried out manually, but automated devices equipped with temperature control for cold-injection or valve-loop-injection systems are also available. In these cases, the sample vial is pressurized (usually 22.5–30 psig) and vapor is allowed to escape through a valve-sampling loop that has a fixed capacity and is held at a higher temperature than that of the sample vial. After sampling, the valve rotates and a determined flow of carrier gas is supplied into the loop to sweep volatiles towards a transfer line coupled to the GC system [8].

2.1.3. S-HS parameters

The most important parameters affecting S-HS sampling are the temperature of the sample and the sample volume in an HS vial, as HS sensitivity depends upon the combined effect of K and β {for a detailed explanation, see [4]}. Optimization of these variables depends on analyte properties (e.g., volatility, polarity and matrix affinity), but characteristics of the sample matrix (e.g., lability) should also be taken into account.

Regarding temperature control, temperatures in the range 45–150°C, depending on the stability of target compounds and/or the sample matrix, are usually employed. Optimization of equilibrium time (or sampling time if equilibrium is not reached) is also required to ensure that the analysis is performed at equilibrium or to assure reproducibility in HS sampling under selected conditions.

Sensitivity might also be improved using low HS-to-sample volume ratios, mainly for analytes with low solubility in the condensed phase. However, other options, such as the addition of salts to the analyte solution (the so-called “salting-out effect”), and the use of solvents to dissolve the sample, have also been described [4]. In the salting-out effect, the most common approach, the solubility of the hydrophobic analytes in the water solution decreases with increase in ionic strength, so concentration of these compounds in the HS is higher.

The use of other novel solvents, such as room-temperature ionic liquids (RTILs), and different emerging HCC-HS techniques and sample-preparation procedures as a way to enhance S-HS sensitivity were recently reviewed by Snow and Bullock [9], so we compile here only the most significant developments regarding the use of these solvents published since that date.

ILs are low-melting-point salts that exist in liquid phase at relatively low temperatures (generally below 150°C). They are considered environment-friendly solvents and seem to constitute a safe alternative to the use of traditional volatile organic solvents. Considering their high viscosity, ILs are being successfully used as fiber coatings in HS-SPME [10] or as single drops in HS-SDME [11] analysis of samples in different fields. Moreover, it has also been demonstrated that ILs have potentially useful dual-nature properties to be used as solvents in S-HS. They can be simultaneously retentive for both polar and non-polar solutes and can be highly

retentive for specific functional groups. Different applications regarding the use of ILs as solvents for HS-GC analysis of different compounds, mainly in pharmaceutical or environmental areas, have been developed and we discuss them in the following sections. However, research in this field is still limited and the price of ILs is not yet affordable for routine analysis.

Sampling of volatile compounds is affected by the composition of the matrix. It is known that, in aqueous systems, the retention of aroma compounds can be modified by their physicochemical interactions with proteins, polysaccharides or lipids [12,13]. As an example, Samavati et al. [14] studied the partitioning and the release of two volatile compounds (ethyl acetate and diacetyl) from two model systems, one rich in polysaccharides (Tragacanth gum) and the other in oleic acid. The increasing concentrations of these constituents decreased the diffusion rate of aroma compounds through the interface of the solution in both matrices, but a higher retention of target compounds was observed in the model containing oleic acid.

2.1.4. Applications

S-HS is routinely used by scientists in a wide range of disciplines and numerous applications are continually emerging in different fields. Some remarkable studies, grouped by the type of sample, are described below. In addition, Table 1 summarizes, for each of these studies, the main objective and specific experimental conditions used for both S-HS sampling and GC analysis.

2.1.4.1. Pharmaceutical products. S-HS-GC is commonly used in the pharmaceutical industry for identification and control of residual solvents (RSs) [26]. These compounds are analyzed following an official method described in the European Pharmacopoeia [27]. Matrix media include water, in case of water-soluble samples, and organic solvents, such as *N,N*-dimethylformamide (DMF) and dimethyl sulfoxide (DMSO), in case of water-insoluble samples [28,29]. However, although this method proved to be suitable for most RSs, it is not sensitive enough for the analysis of high-boiling-point compounds, such as DMF, *N,N*-dimethylacetamide and DMSO, which can also be present as RSs in pharmaceutical products [30]. Moreover, due to their low vapor pressure, they possess high partition coefficients in most dilution media, their sensitive detection being challenging [31]. To overcome this drawback, the search for new solvents as dilution medium has attracted great interest. D'Autry et al. [30] proved the utility of liquid paraffin as a new dilution medium for the analysis of these RSs. The optimized method showed lower limits of detection (LODs) (below 1 µg/vial for each compound) than those of Pharmacopoeia, with good accuracy and reproducibility.

As commented above, the extremely low vapor pressure of ILs promoted their use as matrix media in green HS-GC-MS procedures for analysis of RSs in the pharmaceutical field [15–17,32–34]. As an example, Laus et al. [15] showed the utility of using 1-*N*-butyl-3-methylimidazolium dimethyl phosphate ([BMIM] [DMP]) as solvent for the successful HS-GC-MS analysis of DMSO, *N*-methylpyrrolidone, sulfolane, tetralin, and ethylene glycol in a realistic matrix of commonly-used excipients (carboxymethylcellulose, magnesium stearate, guar flour, and corn starch) in pharmaceutical products.

More recently, Ho et al. [17] evaluated the use of ILs as a new class of solvents for the analysis of two kinds of genotoxic impurities (alkyl/aryl halides and nitro-aromatics) in small-molecule drug substances by S-HS-GC coupled to electron-capture detection (ECD). LODs (5–500 ppb of analytes in a drug substance) were up to tens of thousands-fold lower than those obtained using traditional HS-GC diluents such as DMSO. Among the ILs tested, the best results were achieved using 1-*N*-butyl-3-methylimidazolium bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]imide {[BMIM][NTf₂]}.

Frink et al. [16] recently developed a new method to determine the water content in solid active pharmaceutical ingredients (APIs) by HS-GC using ILs as both solvent and stationary phase of an open tubular capillary GC column (SLB-IL107). Among the ILs studied, 1-ethyl-3-methylimidazolium tris(penta-fluoroethyl)trifluorophosphate {[EMIM] [FAP]} showed the best results regarding solubility of the APIs. Dissolved samples were purged with dry argon to achieve low background-water content for better accuracy. Different HS parameters (initial purge time, equilibrium time and temperature) to improve sensitivity and efficiency of the method were evaluated. Optimal conditions are shown in Table 1. Regarding the detector, a barrier-ion-discharge detector (BID) was compared to a thermal-conductivity detector (TCD). Both were appropriate to determine the low levels of water required, but the BID was more sensitive. This method showed advantages over the well-known Karl Fischer titration method (e.g., the absence of by-side reactions and solubility problems).

2.1.4.2. Foods. S-HS has been proposed by many researchers as a useful tool to determine food quality. As an example, Güler et al. [18] developed a S-HS-GC-MS method to analyze the volatile aromatic compounds of melons from different varieties. Most valuable varieties from a sensory point of view turned out to be those with higher concentrations of esters. Moreover, the correlation of volatile compounds with aroma allowed the distinction among melon varieties.

Determination of residual solvents by HS-GC is also applied in the food field. Ligor and Buszewski [19] compared two different procedures based on SPME-GC-MS and S-HS-GC-MS to determine the composition of RSs of vegetable oils. Results obtained by both methods showed a high correlation ($R^2 = 0.9943$), indicating the feasibility of the S-HS technique for the analysis of these compounds. Moreover, both methods presented several advantages, such as high sensitivity (analyte concentrations down to the ppm or ppb levels), short extraction times (of the order of minutes), easy automation and simplicity.

Recent advances in HS extraction in the food field are towards the improvement of sensitivity and accuracy in quantitative analysis. Pérez-Pavón et al. [35] developed a sensitive method based on the use of HS coupled to a programmable temperature vaporizer (PTV)-GC-MS system for the fast analysis of filbertone in spiked olive oil samples. The use of a PTV inlet with a liner packed with Tenax-TA allowed compounds more volatile than filbertone to be purged during the venting process, whereas this target compound was retained. LODs and limits of quantitation (LOQs) achieved for filbertone by using this method were as low as 0.27 µg L⁻¹ and 0.83 µg L⁻¹, respectively.

2.1.4.3. Environmental samples. VOCs emitted by industrial processes, pesticides, and traffic are dangerous to human health or cause harm to the environment. S-HS-GC is one of the techniques of choice to evaluate their presence in different matrices (e.g., air, water and landfill leachates).

Sanjuán-Herráez et al. [20] developed a new methodology based on the use of membranes as receptors of VOCs from indoor air of vehicle-repair shops that were then analyzed by S-HS-GC-MS. Devices were placed in two different sampling sites of these vehicle-repair shops for different exposure times (8–96 h). VOC concentrations varied, depending on the daily activity of the vehicle-repair shop, but mean values were always below the legislation levels. For all compounds, LODs and relative standard deviation (RSD) values of the method were 15–75 ng and from 2.8–9.2%, respectively. This methodology is a green option, which avoids the use of organic solvents and the addition of reagents. A similar methodology was successfully applied to determine the VOCs released at different steps of the wine-making process [36].

Table 1
Some of the most recent applications of S-HS technique for analysis of volatile compounds in different matrices

Sample	Aim	S-HS sampling	Chromatographic conditions	Ref.
Pharmaceutical products				
Drug matrix	Evaluation of ILs as solvents for determination of residual solvents	-Sample volume: 10 μ L of a solution of the analytes in DMF + 1 mL of [BMIM] [DMP] and 100 mg of matrix in 20 mL vials; -Equilibration: 200°C (15 min).	Split mode (25:1); Column: DB-624 (60 m \times 0.25 mm, 1.4 μ m); Oven program: 120°C (150°C for ethylene glycol) (5 min)-15°C min ⁻¹ -250°C (20 min); MS detector; Interface temperature: 150°C.	[15]
Solid active pharmaceutical ingredients	Development of a procedure to determine residual water content	-Purge time: 2 min; -Equilibration: 125°C (30 min).	Injector temperature: 280°C; Column: SLB-IL107 (30 m \times 0.25 mm, 0.2 μ m); Oven temperature: Isotherm 100°C (7 min); Detector temperature: 250°C; Split mode: 5:1(for GC-TCD)/100:1 (for GC-BID).	[16]
Small molecule drug substances	Determination of genotoxic impurities	-Sample volume + IL: 500 μ L in 10 mL vials; -Equilibration time: 10 min; -Sample loop: 230°C; -Transfer line: 240°C.	Injector temperature: 250°C; Split mode (1:1); Column: VF-624ms (30 m \times 0.32 mm, 1.8 μ m); Oven program for alkyls/aryls: 100°C-10°C min ⁻¹ -150°C (10 min)-10°C min ⁻¹ -280°C (2 min); Oven program for nitroaromatics: 150°C (10 min)-20°C min ⁻¹ -280°C (15 min); ECD temperature: 300°C.	[17]
Foods				
Mushrooms	Comparison of S-HS (pressure loop system and gas-tight syringe) and SPME for analysis of volatile compounds	S-HS pressure loop system: -Equilibration: 75°C; -Loopfill time 0.1 min; -Vial pressure time 0.35 min. S-HS gas-tight syringe: -Equilibration: 75°C; -stirring speed: 500 rpm.	Injector temperature: 250°C; Split mode (10:1); Column: DB-FFAP (30 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m); Oven program: 50°C (4 min)-15°C min ⁻¹ -160°C-2°C min ⁻¹ -200°C; MS detector.	[8]
Two model matrices containing polysaccharides and lipids	Study of the partitioning and release of ethyl acetate and diacetyl	-Sample volume: 10 mL in 25 mL vials; -Equilibration: 20°C (3 h).	Column: EC-5 MS (50 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m); MS detector.	[14]
Melons	-Analysis of the volatile composition -Establishment of relationships aroma vs. volatile composition -Classification of varieties	-Sample amount: 10 g + 3 g NaCl in 20 mL vials; -Equilibration: 45°C (30 min)-75°C (10 min)-5 times stirring-75°C (5 min).	Injector temperature: 200°C; Splitless mode; Column: HP-INNOWAX (30 m \times 0.32 mm, 0.25 μ m); Oven program: 45°C (1 min)-1.5°C min ⁻¹ -80°C-10°C min ⁻¹ -200°C (15 min); MS detector; Interface temperature: 250°C.	[18]
Vegetable oils	Comparison of S-HS and SPME for determination of solvent residues	-Equilibration: 95°C (25 min); -Vial pressurized for 72 s; -Loop temperature: 110°C; -Loop fill time: 2 s; -Loop/transfer line temperature: 96°C; -Sample volume 10 mL in 22 mL vials.	Injector temperature: 185°C; Splitless mode (0.5 s); Column: SB11 (30 m \times 0.32 mm, 0.25 μ m); Oven program: 40°C (3 min)-4°C min ⁻¹ -100°C-15°C min ⁻¹ -150°C (6 min); FID temperature: 200°C.	[19]
Environmental samples				
Air of vehicle repair shops	Analysis of VOCs by using membrane devices	-Vial volume: 10 mL; -Extraction: 150°C, 10 min; -Syringe temperature 150°C, constant air flow purge.	Injector temperature: 200°C; Split mode (1:10); Column: ZB-5MS (30 m \times 0.32 mm, 0.25 μ m); Oven program: 40°C (9 min)-20°C min ⁻¹ -200°C (2 min); MS detector.	[20]
Leachates from sanitary landfill	Comparison of S-HS and SPME for determination of five VOX	-Sample volume: 5 mL in 10 mL vials; -Equilibration: 75°C (15 min); -Sample loop volume: 1 mL; -Loop/transfer line temperature: 110°C; -Sample vial pressure: 16 psi; -Loop fill time: 0.03 min; -Injection time: 1 min.	Injector temperature: 250°C; Split mode (75:1); Column: HP-5MS (30 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m); Oven program: 45°C (5 min)-15°C min ⁻¹ -150°C (1 min); MS detector.	[21]
Sea water	Determination of benzene, toluene, ethylbenzene, xylene (BTEX), and styrene	-Equilibration: 60°C (5 min); -Injection time: 0.5 min; -Loop temperature: 110°C; -Transfer line temperature: 120°C; -Loop fill time: 0.5 min; -Loop equilibration time: 0.10 min; -Injection time: 1 min.	Column: HP5-MS (30 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m); Oven program: 50°C (4 min)-15°C min ⁻¹ -170°C (5 min); FID and MS detector (Split ratio FID:MS, 2:1).	[22]

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Sample	Aim	S-HS sampling	Chromatographic conditions	Ref.
Fuels Motor oils	Analysis of antioxidants	-Equilibration: 95°C (15 min); -Injection volume from HS to PTV 2.4 mL (syringe at 100°C).	PTV: Solvent vent mode; Purge: 60°C, 0.60 min, 150 mL min ⁻¹ ; Injection: 60°C–12°C s ⁻¹ –325°C (5.44 min); Injection time: 1 min; GC: Split injection (1:10; 325°C); Column: DB-VRX (20 m × 0.18 mm, 1 μm); Oven program: 110°C (1 min)–65°C min ⁻¹ –175°C–45°C min ⁻¹ –240°C (2 min); MS detector.	[23]
Bio-oils	Comparison of S-HS derivatization and on fiber derivatization SPME for determination of low-molecular mass aldehydes	-Sample volume: 2 mL in 10 mL vials; -Derivatization conditions: O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl) hydroxylamine hydrochloride, 85°C, 20 min, 350 r.p.m.	Injector temperature: 260°C; Split mode; Column: VF-1701 (60 m × 0.25 mm, 0.25 μm); Oven program: 80°C–3°C min ⁻¹ –150°C–40°C min ⁻¹ –280°C (5 min); MS detector.	[24]
Biological samples Urine samples	Determination of aldehydes	-Sample volume: 1 mL in 10 mL vials; -Equilibration: 84°C, 10 min, 750 r.p.m.; -Injection volume from HS to PTV 2.5 mL (syringe at 120°C).	PTV: Initial injector temperature: 50°C; Initial time: 0.55 min; Vent flow: 20 mL min ⁻¹ ; Vent pressure: 5 psi; Purge: 60°C, 0.50 min; Injection: 60°C–12°C s ⁻¹ –250°C (2 min) GC: Column: DB-VRX (20 m × 0.18 mm, 1 μm); Oven program: 45°C (2 min)–60°C min ⁻¹ –175°C–45°C min ⁻¹ –240°C (0.5 min); MS detector.	[25]

Florez-Menéndez et al. [21] evaluated the use of S-HS and HS-SPME for recovery of five volatile organochlorine compounds (VOX), namely chloroform, 1,1,1-trichloroethane, carbon tetrachloride, trichloroethene and tetrachloroethene, in raw landfill leachates and biologically-cleansed leachates. After optimization of experimental conditions (see Table 1 for optimal parameters), the LODs of both procedures were at the sub-ppb level. HS-SPME was faster than HS (extraction times of 2 min *versus* 15 min); however, HS-GC-MS offered better analytical precision (2.5–3.5%) than HS-SPME-GC-MS (10–16%). Both techniques provided good recoveries for all analytes under study ($\pm 5\%$ agreement).

The analysis of pollutants, such as xylene and styrene in water, requires the development of simple, cheap analytical methods with low LODs. The utility of S-HS-GC-MS for analysis of these compounds in sea water was recently demonstrated by Yilmazkan et al. [22]. Moreover, the use of PTV in solvent-vent mode was proposed as a HS injection system for the analysis of different drugs {e.g., ibuprofen [37,38]} and pollutants {e.g., gasoline oxygenates and benzene, toluene, ethylbenzene and xylene [39]} in waters. This device provided better results (high sensitivity, low LODs and good accuracy and precision) than the conventional split/splitless injection modes.

2.1.4.4. Other samples.

2.1.4.4.1. Fuels. HS-GC-MS has been commonly used to identify gaseous components of engine oils [40]. Del Noyal et al. [23] developed a sensitive, accurate method based on S-HS sampling in combination with a GC system equipped with a PTV and an MS detector to analyze antioxidants in engine-oil samples. The method did not require any sample treatment prior to analysis, the use of a PTV in solvent-vent injection mode allowed the pre-concentration of the compounds of interest in a liner filled with Tenax-TA, while venting other species present in the HS, and no matrix effect was observed.

Bio-oil is a dark brown liquid produced after pyrolysis of biomass (e.g., wood sawdust). It is composed of water and hundreds of oxygenated organic compounds. Among them, bio-oil contains several volatile aldehydes, some of them toxic, such as formaldehyde. Tessini et al. [24] developed a method based on a derivatization procedure (use of O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl) hydroxylamine hydrochloride as derivatization reagent) for the analysis of aldehydes in this product using two different approaches:

- in-solution derivatization and HS extraction; and,
- on-fiber derivatization SPME.

Although both sample treatments allowed quantification of most important aliphatic aldehydes in bio-oil, the SPME approach was more efficient for preconcentration of analytes on the fiber. However, the main disadvantage of on-fiber derivatization SPME was the brief life-time of the fibers (20 bio-oil samples).

2.1.4.4.2. Polymer products. Polymers contain low-molecular-weight residual compounds, by-products of polymerization, additives and degradation products that migrate from the polymers into the surrounding environment [41]. These volatile compounds can be analyzed by HS-GC-MS, and the use of this technique is proposed by the American Society for Testing Materials (ASTM International) for their qualitative analysis [42].

2.1.4.4.3. Biological samples. A HS-GC-MS method based on the use of a PTV has been optimized using experimental design for the quantitative determination of aldehydes in urine [25]. Good linearity, low LOQs (0.12–0.24 μg L⁻¹) and appropriate accuracy (recoveries of 86–120%) were achieved. This method turned out to be a good alternative to more complex, tedious extraction and preconcentration techniques [e.g., SPE and hollow-fiber liquid-phase

microextraction (HF-LPME)] for the analysis of these endogenous compounds in urine samples.

2.2. Dynamic headspace

D-HS techniques, unlike S-HS, have the common characteristics of using a flow of inert gas for continuous extraction of volatile compounds from a sample and their further preconcentration into an adsorbent or cryogenic trap. In its more general form of application, the so-called “purge and trap” (P&T) technique, the flow of gas is bubbled through the bulk of the sample rather than passed over the matrix, so increasing volatile recovery. Release of volatile compounds from this trap, generally carried out by increasing the temperature, allows their transfer into the chromatographic system for further analysis.

As for other sampling techniques, after a single HS step, only partial recoveries are achieved for most volatiles. In many applications, such as those aimed at sample characterization or classification, these data are enough as a first estimation of the quantitative volatile composition of the samples under study. However, when accurate determination of C_0 is intended in solid or semi-solid samples with noticeable matrix effects, and for which matrix-matched or standard-addition calibrations are not feasible, multi-step HS extraction (MHE) approaches based on stepped HS extraction are usually employed [4]. In MHE, as successive HS aliquots are removed, after an infinite number of extraction steps, all volatiles are exhaustively extracted. In practice, MHE approaches rely on a limited number of consecutive extractions, after which extrapolation models are applied to determine C_0 .

Due to the common application of the D-HS technique in the MHE mode, sub-section 2.2.1. describes the fundamentals of both techniques, whereas applications of MHE are discussed in sub-section 2.3.

2.2.1. Fundamentals

According to Kolb et al. [4,43], volatile sampling by D-HS is based on the following equation:

$$C_i = C_0 \cdot e^{-qt} \quad (5)$$

in which the concentration C_i of an analyte remaining in the sample after a continuous sweeping process depends on the original concentration C_0 and decreases exponentially with time t , q being a constant of proportionality related to the recovery. Chromatographic peak areas A_i and A_0 are proportional to analyte concentrations C_i and C_0 , respectively.

When the stepwise mode is selected, and considering peak areas rather than concentrations, Equation (5) becomes Equation (6) for every successive step (i):

$$A_i = A_1 \cdot e^{-k(i-1)} \quad (6)$$

where A_1 is the peak area obtained in the first extraction step and k , if extraction is carried out in an automated instrument, represents a constant related to some constant instrumental parameters.

If A_0 represents the total peak area associated with the original analyte concentration C_0 ,

$$A_0 = \Sigma A_i = A_1 \cdot (1 + e^{-k} + e^{-2k} + \dots), \quad (7)$$

its value can be estimated from the sum of the geometric progression in Equation (7) as:

$$A_0 = A_1 / (1 - e^{-k}) \quad (8)$$

Recovery models should provide a relationship between the desorbed amount of analyte and its total amount in the sample, which can be estimated from GC data as the ratio between the experimental peak area (A_i) and the peak area corresponding to the total

analyte amount (A_0). The recovery (R) for the first extraction step is calculated in this way as:

$$R = A_1 / A_0 = 1 - e^{-k} \quad (9)$$

The model proposed by Kolb et al. [4,43] uses the logarithmic form of Equation (6):

$$\ln A_i = -k \cdot (i - 1) + \ln A_1 \quad (10)$$

to obtain k by linear regression. Equation (10) and experimental A_i values are then used to obtain A_0 and R .

Finally, and if data are linear, Equation (8) can be simplified to obtain total analyte amount using data for only the first two extractions [Equation (11)]. Although valid for practical purposes, more accurate results are expected by using a higher number of data points.

$$A_0 = \frac{A_1}{1 - \left(\frac{A_2}{A_1}\right)} = \frac{A_1^2}{A_1 - A_2} \quad (11)$$

This MHE model, in spite of having been criticized initially, proved to be theoretically correct and experimentally useful, and it allows use of improved statistical methods for the estimation of recovery and total volatile amount (e.g., see [44] in sub-section 2.3).

2.2.2. Instrumentation

Different designs of D-HS extractors/concentrators are commercially available. All include as main parts a sample vessel, a trap and different devices (e.g., flow-pressure regulators, valves, and probes) for regulation and control of purge gas and temperature throughout the whole system. A few extractors also offer the ability to dry purge the trap after the purge step to remove water that may have accompanied target volatiles during this step and which, e.g., can block the flow of gas (if condensed in cold traps), or destabilize the GC stationary phase [45,46]. Furthermore, several instruments allow, after thermal desorption of the retention trap (primary trap), a secondary trapping of volatiles by cryofocusing before injection onto the GC. This is usually achieved in fused-silica traps cooled by liquid nitrogen or CO_2 [47]. The fast injection from these secondary traps, faster than from adsorbent, decreases peak broadening and improves separation and sensitivity [47,48].

Although most D-HS extractors are coupled on-line to GC systems, others are designed for off-line operation, when cartridges or traps with purged volatiles are desorbed in an additional facility [thermal desorption (TD) unit], which is coupled on-line to the GC-MS apparatus. Depending on sample characteristics, this sort of TD unit can also be used for direct D-HS sampling: volatiles are thermally desorbed from the sample and swept by a continuous flow of inert gas into a secondary trap, which is then heated for transfer of volatiles into the GC-MS system [49,50].

2.2.3. D-HS parameters

As in S-HS sampling, different parameters should be optimized in the development of a D-HS method; the purge volume and the extraction temperature are the most important. Sample vessels of different design (needle-sparg vessel, purge tube with frit or fritless purge vessel) should be chosen according to the characteristics of the sample and the mode of extraction selected: surface sweeping or P&T. Dilution in case of high-viscosity samples or addition of antifoaming agents, such as 1-tetradecanol, are also required sometimes [51–53]. As in S-HS, optimal temperature is determined by analyte and matrix characteristics. The flow of inert gas ($15\text{--}40 \text{ mL min}^{-1}$) and purge time ($2\text{--}15 \text{ min}$) should be optimized considering the breakthrough volume, defined as the largest

volume per gram of sorbent that can be sampled without significant loss of sample from the trap.

Regarding volatile preconcentration, a wide variety of traps and cartridges with different dimensions, composition (e.g., Tenax, Silica Gel, Chromosorb, graphitized carbons (Carbotrap), or carbon molecular sieves), thermal stability and desorption characteristics are available [54]. Despite several applications relying on the use of multi-bed traps [55–57], single traps made of Tenax sorbent are the most common, due to their applicability to compounds in a wide volatility range, high temperature stability, low water affinity and long shelf life (see Table 2). For every application, desorption temperature and time, usually 220–260°C and 2–15 min, respectively, should be optimized considering analyte and trap properties. Cooling of traps with liquid N₂ or CO₂ are alternatives for preconcentration of very thermolabile compounds.

2.2.4. Applications

2.2.4.1. Food and plant samples. As an example of the large number of papers devoted to the development and validation of D-HS methods for food characterization, Manzini et al. [59] optimized, by experimental design, a P&T followed by TD-GC-MS for the determination of furfurals in 29 *Aceto Balsamico Tradizionale di Modena* vinegars. In addition to other operating variables commonly optimized (e.g., incubation temperature and time, purge volume, dry volume and thermal desorption time), the performance of two different sorbents (Tenax TA and Tenax GR) for furfural trapping were also evaluated. Under optimal conditions (Table 2) and selecting Tenax TA as sorbent, with similar trapping capability to Tenax GR but providing more reproducibility, the method developed showed good reproducibility (RSD < 10%), so it was shown to be simple, fast and highly automated for QC of vinegars.

A number of studies have also evaluated the performance of D-HS compared to other HCC-HS techniques, mainly SPME, for characterization of food aroma with different purposes (e.g., food authentication, QC, and effect of food-processing techniques) (Table 2). In many of these studies, results were also compared with those from sensory methods in an attempt to determine the most odor-active compounds.

Mallia et al. [58] compared P&T and SPME for the analysis of the aroma compounds of three European Protected Designation of Origin (PDO) cheeses (Gruyère, Manchego and Ragusano). As expected, the profiles obtained by using each technique were different, with P&T being particularly suitable for sampling of very volatile compounds (e.g., linear and branched alcohols, and diketones), whereas SPME was more effective for extracting medium and low-volatility compounds (e.g., fatty acids). The composition of cheeses obtained by each technique was also quite distinctive and allowed, after application of statistical analysis, correct classification of cheeses according to their PDO.

In a similar characterization study by Liu et al. [46], the volatile composition, the non-volatile components and the sensory properties of the most common monovarietal white wine (var. Solaris) in Denmark were studied. A total of 79 compounds were determined by P&T-GC-MS. Partial least squares (PLS) regression showed that acetates and ethyl esters of straight-chain fatty acids were associated with floral and fruity odors, whereas other volatiles, such as ethyl esters of branched-chain fatty acids, were less associated with them. From the results of this study, we can also conclude that differences in wine vintage were less significant than differences due to sulfite management by producers.

Rivas-Cañedo et al. [55] compared the performance of P&T and SPME for sampling of volatiles in ground beef subjected to high-pressure processing (HPP) and further three-day refrigerated storage. Despite the volatile profiles of control samples (neither stored nor pressurized) provided by both techniques being comparable, they turned out to be completely different for stored untreated and HPP

samples. In the conditions of this study, SPME proved to be a more sensitive technique than P&T for monitoring the changes undergone in meat subjected to different treatments. However, the very significant decrease during storage of some volatiles, such as 2,3-butanedione, was better followed by P&T. The results of this study highlighted that volatile profiles strongly depend on the method of extraction, among other factors, which should be taken into account when experimental results are to be compared with literature data.

Lozano et al. [45] evaluated by sensory and instrumental methods the heat-induced odorants in ultrahigh-temperature (UHT)-processed soy milk. D-HS dilution analysis (DHDA) and solvent-assisted flavor evaporation (SAFE) were selected as complementary techniques to fractionate the wide range of aroma-active volatiles present in this sample (for experimental conditions, see Table 2).

Murat et al. [56] also compared the performance of three different sampling techniques (P&T, SPME and SAFE) followed by GC-MS to select the most suitable HS-sampling method to provide a fraction representative of the odor of pea (*Pisum sativum*) flour. Compared to SAFE and SPME, the P&T technique allowed identification of a higher number of volatiles. SAFE was particularly useful for extraction of very polar compounds, such as alcohols, and SPME for benzene derivatives and terpenes; very volatile compounds (e.g., ethanol, propan-2-ol, and butan-2-one) were extracted by only P&T. SAFE and SPME extracts were perceived to be the most representative of the global odor of pea flour. The fact that several polar compounds with a “green” and “vegetable” odor were poorly recovered or even only extracted by SAFE and SPME could be responsible for these conclusions.

In a review by Bicchi et al. [5] on the techniques used most for sampling volatiles from vegetable matrices, D-HS was shown as the most widely used technique in the plant field, due to its flexibility (e.g., sampled volume and operating conditions) in achieving the required sensitivity. As an example, Sanz et al. [49] developed a method by TD-GC-MS for analysis of volatile components of wild samples of *Lavandula luisieri* collected in Central and Southern Spain. This simple, fast method, with short analysis time and requiring a small sample amount (only 10–20 mg of dry sample), allowed qualitative and quantitative analysis of different plant parts, such as flowers and leaves. Furthermore, multivariate statistical analysis of data for nine selected compounds allowed determination of several patterns of plant composition that were only partly related to the site of collection.

Characterization of food samples for different purposes requires that the dispersion of quantitative data is minimized. Soria et al. [52] optimized P&T as a sampling technique for the GC-MS analysis of the volatile composition of 22 commercial honeys of eight different botanical sources. Some 100 volatiles were determined, including compounds derived from the floral nectar/honeydew source and from processing and storage conditions; 18 of them were reported in honey for the first time. As for precision of quantitative data, this method was also validated: relative data (percentage of total volatile composition) showed lower dispersion than data obtained by the internal standard (IS) method. The use of a single IS for quantitation of volatiles with different properties and/or its incomplete homogenization in honey matrix could explain these results.

In a subsequent study by the same authors [53], statistical analysis was used for the first time to evaluate the dispersion of percent data in the P&T-GC-MS analysis of honey volatiles with the aim of improving their precision. The comparison of experimental and randomly-simulated data by different statistical parameters [i.e., correlation coefficients, principal component analysis (PCA) eigenvalues and loadings] showed that non-random factors significantly contributed to the total dispersion of data. A significant improvement in precision was achieved when considering percent concentration ratios, rather than single percent data, among volatiles with

Table 2
Some of the most recent applications of D-HS technique for analysis of volatile compounds in different matrices

Sample	Aim	D-HS sampling	Chromatographic conditions	Ref.
Foods and plants Butter	Comparison of P&T and SPME fractionation techniques	20 g butter; Equilibration: 45°C (5 min); Purge (N ₂): 1 h, 30 mL min ⁻¹ ; Trap (Tenax TA) desorption; 250°C (10 min).	Cold fused silica trap: -120°C; Flash heating injection: 1 min at 250°C; HP-Innowax column (60 m × 0.32 mm, 0.5 μm); Oven program: 40°C (8 min)-4°C min ⁻¹ -210°C (10 min); GC-MS interface temperature: 220°C.	[48]
<i>Lavandula luisieri</i>	TD-GC-MS analysis of volatiles	10–20 mg dry plant; Primary desorption: 180°C (15 min), 20 mL min ⁻¹ He; Cryofocusing Tenax trap; Secondary desorption: -30°C to 320°C (4 min) at 40°C s ⁻¹ ; Inlet/Outlet splits: 50 mL min ⁻¹ ; Transfer line: 225°C.	SPB-1 capillary column (27 m × 0.25 mm, 0.25 μm); Oven program: 60°C-3°C min ⁻¹ -180°C-5°C min ⁻¹ -250°C (5 min); GC-MS interface temperature: 250°C.	[49]
European PDO hard cheeses	Comparison of P&T and SPME fractionation techniques	5 g grated cheese; Equilibration time: 5 min; Purge: 35°C (15 min), 40 mL min ⁻¹ N ₂ ; Dry purge time: 5 min; Tenax trap at 36°C; Trap desorption: 230°C (4 min).	GC/MS/FID: Cryofocusing: -125°C; Desorption: 230°C (1.5 min); DBWax capillary column (60 m × 0.32 mm, 1 μm); Oven program: 45°C (1 min)-5°C min ⁻¹ -250°C (12 min); GC-MS interface temperature: 280°C.	[58]
Aseptically packaged soy milk	P&T followed by GC-MS analysis and sensory characterization of heat-induced odorants	10 mL milk; Purge: 50°C (5 min), 50 mL min ⁻¹ N ₂ ; Purge time: 1, 5 and 25 min (D-HS dilutions); Tenax TA tube desorption: 220°C (10 min).	Cryo-injection: -150 to 260°C (10 min) at 2°C s ⁻¹ ; Stabilwax DA or DB-5 MS column (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm); Oven program: 35°C (5/25 min)-10°C min ⁻¹ -225°C (25 min); GC-MS interface temperature: 280°C.	[45]
Honey samples of different botanical source	-Optimization of a P&T-GC-MS method -Use of statistical analysis for evaluation of dispersion and for improvement of precision of quantitative data -Estimation of recovery by a MHE approach	5 g honey/2 mL H ₂ O; Purge: 80°C (15 min), 37.5 mL min ⁻¹ He; Trap (Tenax) desorption: 220°C (5 min); Transfer line: 200°C.	Cryo-injection: -100 to 220°C in 2 min; Supelcowax-10 column (50 m × 0.25 mm, 0.25 μm); Oven program: 45°C (15 min)-3°C min ⁻¹ -75°C-5°C min ⁻¹ -180°C (10 min); GC-MS interface temperature: 280°C.	[44, 52,53]
Vinegars	Optimization of a P&T followed by GC-MS method for analysis of furfurals	1 mL vinegar + 0.25 g NaCl; Incubation: 40°C (10 min); Purge: 50 mL min ⁻¹ N ₂ , 800 mL; Tenax TA trap; Trap drying: 50°C, 1500 mL, 100 mL min ⁻¹ N ₂ ; Trap desorption: 50°C-50°C min ⁻¹ -280°C (5 min).	Cryo-injection: -150°C-12°C s ⁻¹ -280°C (1 min); Split ratio: 1:20; CPSil 8CB column (60 m × 0.25 mm, 1 μm); Oven program: 40°C (2 min)-5°C min ⁻¹ -150°C-10°C min ⁻¹ -280°C (10 min); GC-MS interface temperature: 290°C.	[59]
Ground beef subjected to high pressure processing	Comparison of D-HS and SPME for fractionation of volatiles	3.5 g cooked meat + anh. Na ₂ SO ₄ ; Purge: 45°C (20 min), 45 mL min ⁻¹ He; Vocarb 4000 trap: 35°C; Dry purge: 4 min; Trap desorption: 260°C (2 min); Transfer line: 200°C.	Injection: 220°C; Split ratio: 1:20; ZB-WAX column (60 m × 0.25 mm, 0.50 μm); Oven program: 45°C (16 min)-4°C min ⁻¹ -110°C (9 min)-15°C min ⁻¹ -230°C (3 min); GC-MS interface temperature: 280°C.	[55]
Pea (<i>Pisum sativum</i>) flour	Comparison of the performance of three extraction methods (P&T, SPME and SAFE) for providing fractions representative of the overall odor of pea flour	35 g of 10% pea flour suspension in H ₂ O; Purge: 30°C (10 min), 20 mL min ⁻¹ N ₂ ; Capillary trap (Tenax); Trap desorption: from -130°C (10 min) to 270°C (15 min).	ZB-1 MS column (30 m × 0.25 mm, 1 μm); Oven program: 50°C (1 min)-4°C min ⁻¹ -160°C-15°C min ⁻¹ -320°C (10 min); GC-MS interface temperature: 240°C.	[56]
Radix Angelicae Dahuricae	GC × GC-TOF MS study of changes in the volatile composition of sulfur-fumigated and sun-dried samples	Purge temperature: from 30°C (20 min) till 150°C (30 min); Purge time: 15 min; He flow: 40 mL min ⁻¹ ; Capillary trap (Tenax-Silica Gel-Charcoal): 40°C; Trap desorption: 180°C (2 min).	Injector temperature: 250°C (split mode); ¹ D column: DB-5 MS (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm); ¹ D oven: 50°C (1 min)-6°C min ⁻¹ -250°C (10 min); ² D column: DB-17 HT (2 m × 0.1 mm, 0.1 μm); ² D oven: 260°C higher than ¹ D oven; Modulation: 6 s.	[57]
Solaris white wines	P&T followed by GC-MS study of volatile composition	20 mL wine; Purge: 37°C (20 min), 100 mL min ⁻¹ N ₂ ; Dry purge: 15 min; Trap (Tenax-TA) desorption: 250°C (15 min), 50 mL min ⁻¹ H ₂ .	Cold trap (Tenax-TA): from 5°C to 300°C (4 min); Split ratio: 1:10; Transfer line: 225°C; DB-WAX column (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm); Oven program: 40°C (10 min)-8°C min ⁻¹ -240°C (5 min).	[46]

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Sample	Aim	D-HS sampling	Chromatographic conditions	Ref.
Environmental samples				
Water	Evaluation of purge efficiency in the P&T-GC-MS analysis of trihalomethanes	10/25 mL water; Purge flow: 40 mL min ⁻¹ He; Purge cycles of 11 min; Purge temperature: 25, 35 and 50°C; CO ₂ cooled Vocab 3000 trap: 10°C; Trap desorption: 225°C (4 min); Transfer line: 150°C.	Injector temperature: 250°C; Split ratio: 1:20; DB-624 column (30 m × 0.25 mm, 1.4 μm); Oven program: 40°C (8 min)–45°C min ⁻¹ –200°C (10 min).	[60]
	P&T-GC-MS analysis of VOCs (including trihalomethanes) in 174 source, tap and bottled waters	Purge: 30°C (11 min), 40 mL min ⁻¹ He; Trap desorption: 250°C (4 min).	Injector temperature: 140°C; VF-624 MS column (30 m × 0.25 mm, 1.40 μm); Oven temperature: from 35°C (6 min) to elution of all VOCs (>220°C, 6 min).	[61]
	Determination by GC-ICP-MS of CH ₃ Hg in humic-rich natural water samples	20 mL distilled and ethylated (NaBEt ₄) water; Purge: room temperature (8 min); Trap (Tenax) desorption: 200°C (15 s).	HP-5 column (15 m × 0.32 mm, 0.25 μm); Oven program: 30°C–30°C min ⁻¹ –60°C; He: 7 mL min ⁻¹ .	[62]
	Target and non-target screening of VOCs by D-HS followed by GC × GC-TOF-MS	5 mL H ₂ O (26°C, 700 rpm); Purge: 300 mL, 15 mL min ⁻¹ He; Trap (Tenax) temperature: 25°C.	Off-line TD of trap: 30°C (0.5 min)–12°C s ⁻¹ –300°C (5 min); PTV injector: –130°C (0.5 min)–12°C s ⁻¹ –250°C (5 min); ¹ D column: TRB-624 (20 m × 0.25 mm, 1.4 μm); ¹ D oven: 35°C (5 min)–4°C min ⁻¹ –105°C–30°C min ⁻¹ –250°C (4 min); ² D column: Suprawax-280 (1 m × 0.1 mm, 0.1 μm); ² D oven: 40°C (5 min)–4°C min ⁻¹ –110°C–30°C min ⁻¹ –270°C (4 min); Modulation: 4 s.	[63]
Sediment, fish tissues and algal cells	Simultaneous determination by MAPTE-GC-MS of five predominant odors in different environmental samples	Purge: 30°C (10 min), 40 mL min ⁻¹ N ₂ ; Trap (Tenax) desorption: 180°C (4 min); Valve temperature: 250°C; Transfer line: 270°C.	Injector temperature: 270°C; Split ratio: 1:10; HP-5 MS column (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm); Oven program: 60°C–15°C min ⁻¹ –150°C–5°C min ⁻¹ –220°C; GC-MS interface temperature: 250°C.	[64]
Others				
Active pharmaceutical ingredient	GC-FID determination of residual solvents	N ₂ flow: 40 mL min ⁻¹ ; Purge: 40°C (7 min); Tenax/Silica gel/Charcoal trap; Dry purge: 40°C (1 min), 200 mL min ⁻¹ ; Primary desorption: 200°C (2 min), 100 mL min ⁻¹ .	Focus temperature: –120°C; Secondary desorption: 130°C (1 min); Injector temperature: 160°C; Split ratio: 1:10; Rtx-1MS column (30 m × 0.32 mm, 1 μm); Oven program: 35°C (3 min)–10°C min ⁻¹ –75°C–30°C min ⁻¹ –200°C (5 min); Detector temperature: 300°C.	[47]
Urine and blood	P&T-GC-FID/MS analysis of styrene	5 mL urine/blood diluted in H ₂ O; Purge: 20°C (11 min), 40 mL min ⁻¹ He; Tenax trap: 20°C; Primary desorption: 180°C (4 min); Transfer line: 180°C.	Capillary silica tube: –100°C; Secondary desorption: 210°C; Injector temperature: 210°C; Oven program: 35°C (3 min)–10°C min ⁻¹ –75°C–30°C min ⁻¹ –200°C (5 min); DB-5 column: (50 m × 0.32 mm, 0.52 μm); Oven program: 80°C (8 min)–5°C min ⁻¹ –120°C (2 min); FID temperature: 250°C.	[65]
Fecal samples	Development of a P&T-GC-MS method for screening of fermentation metabolites	0.25 g fecal sample in 5 mL H ₂ O; Purge: 70°C (20 min), 40 mL min ⁻¹ He; Trap (Vocab) desorption: 250°C (5 min).	AT Aquawax DA column: (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm); He flow: 10 mL min ⁻¹ ; Oven program: 35°C (2 min)–5°C min ⁻¹ –100°C–10°C min ⁻¹ –240°C (5 min); GC-MS interface temperature: 250°C.	[66]

similar dispersion behavior, as pointed out by PCA. This statistical approach, of general application to any other sample type/extraction technique, may contribute to extend the use of P&T-GC-MS for precise quantitative determination of very volatile compounds.

As mentioned above, most studies on analysis of the volatile mixtures fractionated by P&T are usually carried out by GC-MS. However, the recent development of comprehensive two-dimensional GC-time-of-flight MS (GC × GC-ToF-MS), and its advantages in terms of resolution and sensitivity over one-dimensional GC, have promoted the use of this technique coupled on-line to P&T sampling for the analysis of complex mixtures of volatiles in different matrices.

Cao et al. [57] developed a method by P&T-GC × GC-ToF-MS to investigate for the first time the effect of sulfur fumigation and subsequent drying on the volatile composition of sun-dried *Radix Angelicae Dahuricae*, a product derived from the dried root of *Angelica dahurica* and extensively used in Chinese herbal medicine. A total of 32 volatiles, including some of the most active components

of *Radix Angelicae Dahuricae*, disappeared after sulfur fumigation of samples, probably due to volatilization and absorption by sulfur dioxide during the heating process following sulfur treatment (Fig. 1). Some 73 new volatiles, including 3-methyl-thiophene, dimethyl trisulfide and methane sulfonic acid ethyl ester, with reported adverse effects on consumers, were also found in sulfur-fumigated samples (Fig. 1). The proposed method using P&T-GC × GC-ToF-MS was shown to be able to detect commercial samples of *Radix Angelicae Dahuricae* subjected to sulfur-fumigation processes.

2.2.4.2. Environmental samples. P&T-GC-MS methods have been widely reported for analysis of contaminants in environmental samples, mainly in water (Table 2). In addition, many P&T-based methods have become the standardized protocols for analyzing environmental samples (e.g., soil and water) by different regulatory agencies [e.g., US Environmental Protection Agency (US EPA)].

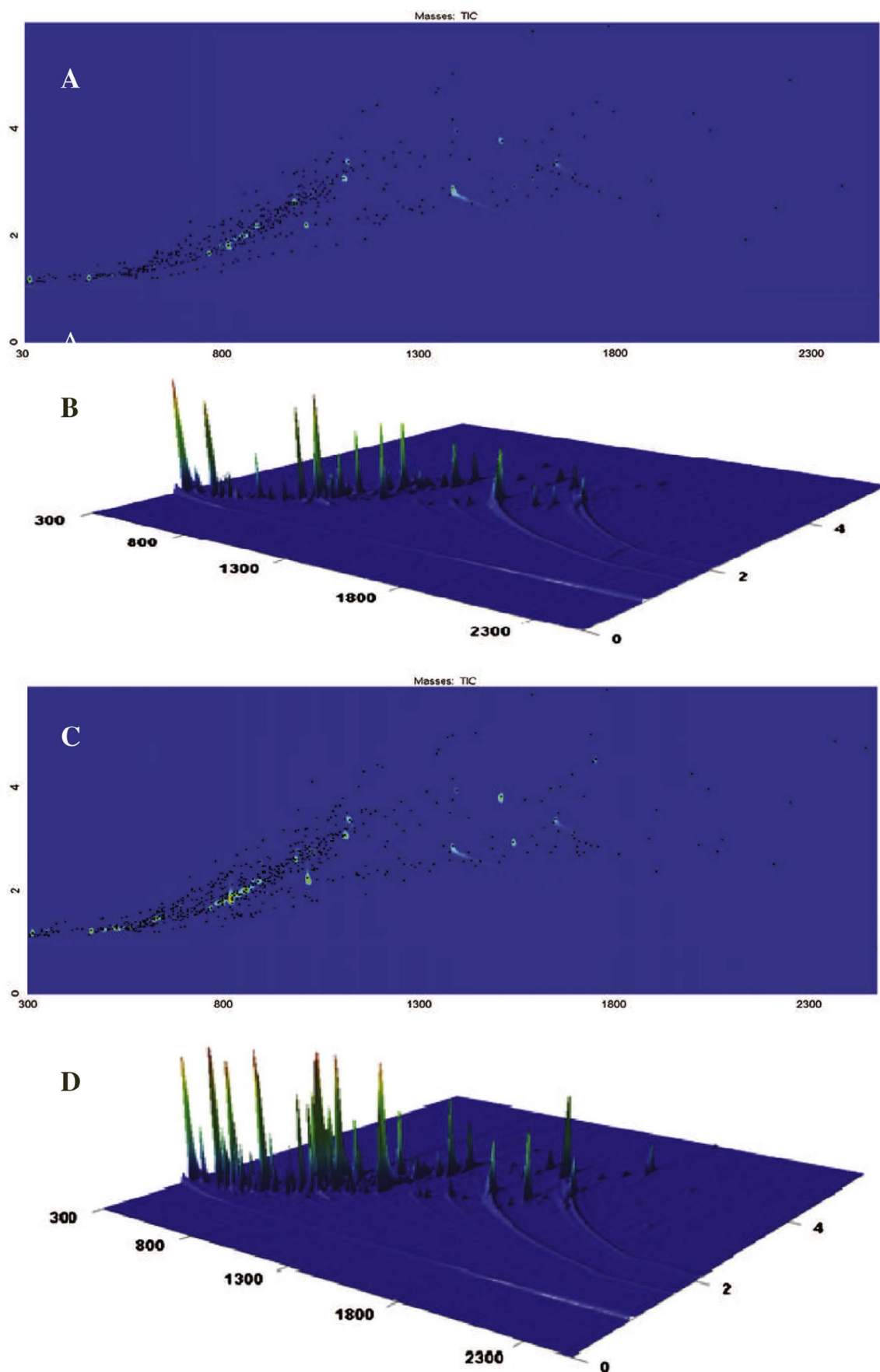


Fig. 1. GCxGC-TOF MS contour plots and three-dimensional chromatograms of sun-dried (A/B) and sulfur-fumigated (C/D) *Radix Angelicae Dahuricae* volatile components. [Reprinted with permission of John Wiley & Sons, Ltd [57]].

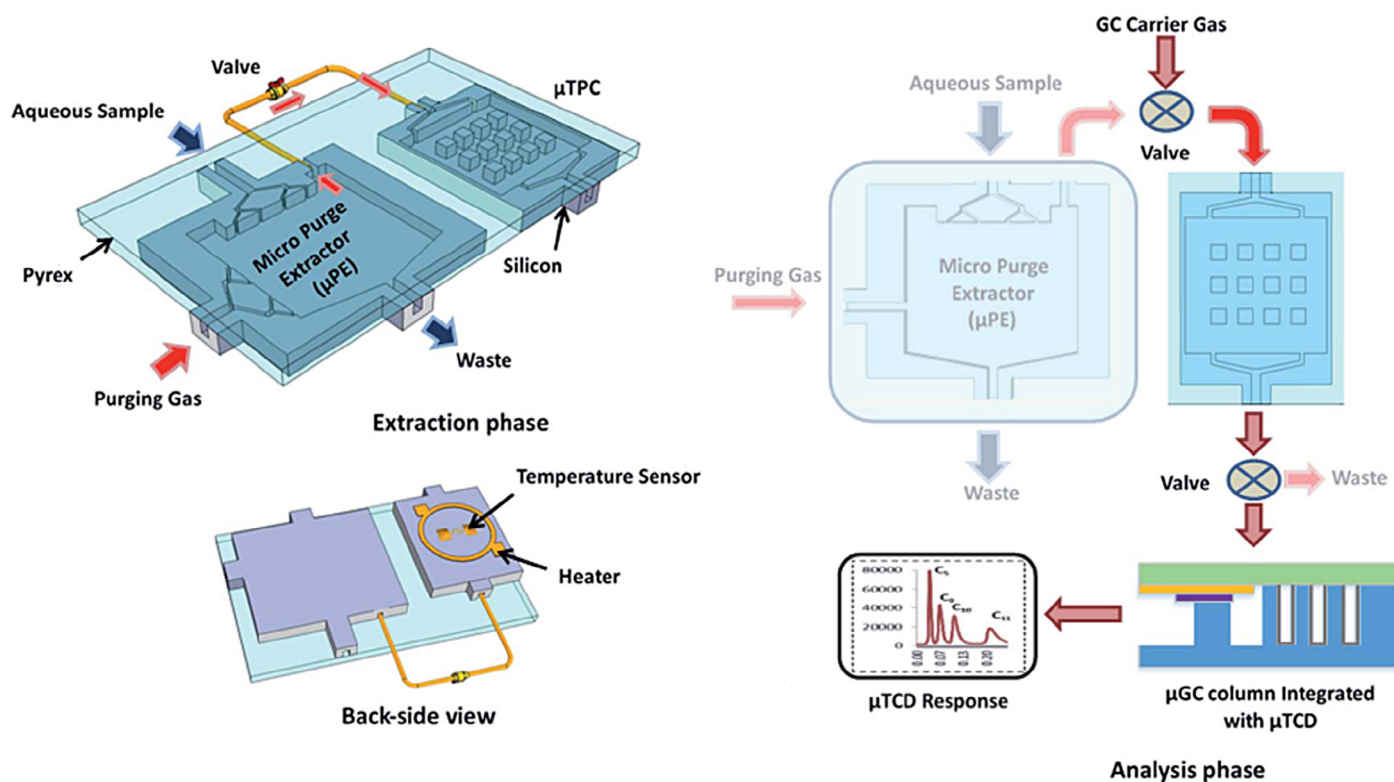


Fig. 2. A purge and trap integrated microGC platform for extraction and analysis of water organic compounds. [Reprinted with permission of the Royal Society of Chemistry [71]].

Besides a number of papers aimed at the optimization of P&T operating conditions with different purposes [60,61,67,68] (Table 2), several works have also addressed the development of novel devices for improved sampling [69] or developed new analytical approaches based on its coupling on-line to 2D-GC separations [62].

A novel multi-bed, needle-type, extraction device, containing particles of divinylbenzene and activated carbon, for the rapid, simple determination of traces of 23 VOCs in tap water was reported by Ueta et al. [70]. After optimization, the use of this device in combination with purge with N_2 of the water sample achieved the successful recovery of VOCs, without sample heating and/or cryogenic focusing, and with the required sensitivity and repeatability for its application to the analysis of real samples.

Akbar et al. [71] recently developed the first micro-purge extractor (μ PE) chip integrated with a micro-scale GC (μ GC) system for the extraction and analysis of water organic compounds (WOCs) (Fig. 2). The μ PE device consists of two inlets, one for the sample and the other for a pure inert gas to purge target analytes. The chip also contains two outlets, one for water waste and one for directing the purged WOCs to the micro-thermal preconcentrator (μ TPC). The trapped compounds, desorbed by resistive heating, are separated on a μ GC column and identified using a micro-thermal conductivity detector (μ TCD) monolithically integrated with the column. This miniaturized system provided on-site, real-time analysis in less than 1.5 min of concentrations as low as 500 ppb of toluene, chlorobenzene, ethylbenzene and tetrachloroethylene in water.

Herrera López et al. [63] reported an effective full-scan method based on D-HS followed by GC \times GC-ToF-MS for screening VOCs in water. A TD unit coupled to a PTV injector was used to deliver VOCs previously extracted and preconcentrated on a Tenax trap into the 2D-GC system. Different operating conditions (i.e., incubation temperature, trap temperature, purge volume, purge flow, transfer heater and sodium-chloride concentration) were optimized to achieve high extraction efficiencies and to increase sensitivity in the analysis of

traces of target (non-halogenated, mono-, di-, tri- and tetra-halogenated) VOCs. Optimal parameters are shown in Table 2. In addition to the enhanced separation provided by 2D-GC and the usefulness of data gathered using a ToF-MS analyzer for positive identification of VOCs, combination of both D-HS sampling and GC \times GC allowed quantitation of these compounds at the parts per trillion level, with no matrix interferences and with minimum sample preparation in the different waters under study (drinking tap-water and bottled water, river and sea water). Additional advantages such as good linearity and intra- and inter-day reproducibility also made this method suitable for routine analysis.

Although GC-MS is the most extensive technique used for HS analysis, P&T systems have also been coupled to GC with detectors other than MS and have even been used in combination with other chromatographic techniques (e.g., ion chromatography) [72]. Pietilä et al. [62] developed an ethylation-P&T with an isotope-dilution GC-ICP-MS method for the determination of low methyl mercury (CH_3Hg^+) concentrations in humic-rich natural waters. Prior to the analytical determination, samples were subjected to N_2 -assisted distillation for separation of CH_3Hg^+ from the interfering matrix and to achieve a low LOD. This sensitive, reproducible methodology, validated with an EPA reference method for accuracy, was found to be reliable for investigating the potential consequences of forest-harvesting practices on biogeochemical cycles and leaching of mercury to natural surface waters.

In the search for a sensitive, effective extraction method for the determination of off-flavors in different environmental samples, Deng et al. [64] developed a rapid, flexible microwave-assisted P&T extraction (MAPTE) device, coupled on-line to GC-MS, for simultaneously determining five predominant odors (dimethyltrisulfide, 2-methylisoborneol, geosmin, β -cyclocitral and β -ionone) in samples of sediment, fish tissue and algal cells. In this easy-to-use extraction/preconcentration device, the rapid heating and large sample throughput provided by microwave-assisted extraction (MAE) is well complemented with the

advantages of P&T as a solvent-free technique, with no matrix interferences and with excellent performance for the extraction of odors. Results obtained in the validation of the method developed (i.e., good linearity and repeatability, and low LODs) proved its potential as a standard methodology for analysis of off-flavors in a variety of environmental matrices.

2.2.4.3. Other samples. P&T sampling, in combination with chromatographic techniques, has also been successfully applied to the analysis of other sample matrices {e.g., APIs [47], urine and blood [65], fecal samples [66]} (Table 2).

2.3. Multi-step headspace extraction (MHE)

In a study by Soria et al. [44] on the volatile composition of honeys determined by P&T-GC-MS (Table 2), performance of six mathematical models applied to data obtained in 2–8 P&T steps was evaluated in terms of fit quality and recovery (*R*) estimation. Results obtained showed that optimal model depended on the type of compound and that, for those few volatiles for which an approximately constant volatile amount was extracted after the initial P&T steps, estimation of *R* and *C*₀ was impossible from multistep strategies.

In a similar MHE approach, Ruiz-Bevia et al. [60] studied the purge efficiency in the determination by P&T-GC-MS of trihalomethanes (THMs) present in a wide range of concentrations in water samples. Whereas the least volatile compound, CHBr₃, required 7–19 cycles (depending on sample concentration) to be purged quantitatively, CHCl₃, the most volatile compound, required only 2–4 extractions. Moreover, it was also concluded that, by applying Novak's model together with Arrhenius-type equations, recovery can be predicted in a purging system under fixed conditions of temperature (*T*) and sample volume (*V*_L) if some previous experimental data for other *T* and *V*_L are available.

Quantitation of VOCs in solid samples of very different natures {e.g., wheat breadcrumbs [73] and roasted coffee [74]} by MHE approaches has also been described. San Román et al. [8] evaluated MHE for the determination of VOCs responsible for mushroom aroma. Two different HS-injection techniques (pressure-loop system and gas-tight-syringe autosampling system) and HS-SPME were compared. Although the three methods were effective for the analysis of VOCs, HS-SPME offered better results in terms of sensitivity and precision; however, a shorter linear concentration range was obtained. Furthermore, MHE-SPME was found to be the most suitable technique to avoid the matrix effect and to obtain acceptable quantitative results for samples of mushrooms.

Other less common applications of MHE approaches included physicochemical studies. For example, Chai et al. [75] reported a simplified MHE-GC method for the determination of solubility of vinylic monomers in water. In this study, the vapor of the two-phase mixture of monomers and water placed in a closed vial was replaced with inert gas to remove the excess of monomer gradually, till the monomer was no longer present as a separate phase. After application of selected models to corresponding GC data, values for monomer saturation in water could be determined.

2.4. HS-MS

Non-separative approaches based on the direct coupling of a mass spectrometer to S-HS or D-HS extraction, in combination with chemometrics, are gaining increasing importance for the development of fast, economical methods for classification of samples, in particular for QC in the food field [76]. In this sort of strategy, volatile compounds present in the HS of a sample are directly introduced into the ionization source of the MS system. The spectrum thus obtained, resulting from ionization and fragmentation of these volatiles, can be considered a representative “fingerprint” of the sample being analyzed

and can be used for classification purposes. The reliability of modern MS systems and the ongoing development of new data-handling strategies, most derived from metabolomics (fingerprinting and profiling), are also contributing to extend use of these “MS-based sensors” or “HS-MS electronic noses” in different fields.

A number of papers have described the development and the application of HS-MS methodologies for QC of olive oils. For example, Peña et al. [77] applied multivariate regression techniques (PLS and PCA) to the sample fingerprints obtained by HS-MS analysis with the aim of generating regression models to detect and to quantify adulteration of virgin olive oils and olive oils with hazelnut oil. The LODs obtained by this method (7% and 15% in refined and virgin olive oils, respectively) were enough to allow the detection of adulterations in commercial olive oils.

Similarly, in a further study, the same authors [78] addressed the usefulness of the HS-MS for evaluating the sensory quality of samples of virgin olive oils. After a training step with oils previously classified according to the official methodology, soft independent modeling of class analogy (SIMCA) was used to create a classification model. Moreover, application of cluster analysis to oil fingerprints allowed discrimination among samples with different negative attributes. The results from this procedure showed an acceptable correlation with those by the expert panel for classification of commercial extra or lampante virgin olive oils.

Cozzolino et al. [79] reported the potential of a HS-MS electronic nose instrument, in combination with chemometrics, for rapid, unbiased prediction of aroma properties (honey, lemon, passion fruit, estery, perfumed floral and stewed apple) in Australian Riesling wine. Although advantageous for the rapid screening of wines before sensory analysis, this methodology lacked the possibility of identification and quantitation of individual compounds responsible for the different aroma notes.

In a study by Gamboa-Santos et al. [80], MS fingerprints gathered by a Headspace ChemSensor system, together with data on vitamin C content and sensorial properties, were evaluated for air-dried carrots previously subjected to different ultrasound (US) or conventional blanching pretreatments. Carrots conventionally blanched at high temperature for a short time showed the highest retention of vitamin C. US-blanching carrots showed an acceptable organoleptic quality similar to that of samples processed by conventional methods. Statistical analysis of MS fingerprints allowed differentiation of carrots with a similar composition and/or blanching treatment, even when indistinguishable by a taste panel of semi-trained judges.

HS analysis of biological samples in combination with computational tools has also been applied for identification of bacteria in biological samples, such as blood [81]. Different data-reduction and pattern-recognition techniques were evaluated to optimize sample classification from data collected using a mass sensor. Thus, combination of Sammon mapping with a radial basis function neural network gave a 100% successful classification rate. These promising results highlight that data-set dimensional reduction via computational methods would be worth considering for rapid medical diagnosis.

As an example of HS-MS approaches in the environmental field, a method for the rapid determination of the total THM index in drinking water was developed by Serrano and Gallego [82]. Once selected ascorbic acid as optimal quenching agent to avoid THM generation from residual chlorine and organic matter during sample manipulation of water, the use of SIMCA before PLS multivariate regression decreased the relative standard error of prediction in estimating the THM index. The results obtained by this fast, straightforward HS-MS method were successfully validated with those provided by a conventional HS-GC-MS method in the analysis of 20 drinking-water samples.

Other approaches based on the use of membrane-introduction MS (MIMS) have also been reported to allow the analysis of VOCs and semi-VOCs mainly from aqueous matrices. These compounds

were fractionated from water by a thin membrane (typically of polydimethylsiloxane) installed between the sample and the ion source of an MS system. Analytes diffused through this membrane and were directly evaporated into the ion source [83]. The combination of both techniques in HS-MIMS resulted in a direct, solvent-free, selective, sensitive method, particularly for wet solid samples, which could also be applied to on-site monitoring of volatiles [84].

3. Conclusions and future trends

The increasing number of developments and applications related to HS techniques in recent years has demonstrated their consolidated potential for routine volatile analysis in different fields. The requirement to avoid organic solvents makes HS sampling advantageous over other traditional methods based on solvent extraction, for the development of green procedures aimed at the analysis of volatile compounds in samples of different natures. Among other strengths, S-HS methods allow sampling of very volatile compounds, otherwise with overlapping solvent peak, and avoid artifacts associated with non-volatile matrix components with a similar polarity to that of the extraction solvent. Moreover, S-HS is a simple, non-destructive technique, so the same sample can be extracted many times in MHE approaches.

The limited sensitivity and the discrimination towards the extraction of not very volatile compounds are generally considered as the main limitations of S-HS methods. D-HS sampling combines the advantages of S-HS with higher sensitivity, especially for extraction of high-volatility compounds. The higher recovery is due to the shift of thermodynamic equilibrium towards the gas phase above the sample, the use of a larger volume of extractant gas phase and the whole volatile fraction extracted being transferred into the GC instrument. Furthermore, sensitivity can be modulated by optimizing the large number of parameters involved in D-HS sampling. This flexibility requires more complex instrumentation and makes maintenance more difficult. However, the availability of automated instrumentation, in which volatile sampling and GC analysis can be carried out simultaneously, has promoted the use of this technique for high-throughput, reproducible analysis of a variety of samples. For example, different standard protocols (e.g., US EPA) rely on the use of the P&T technique for analysis of volatile organic compounds in water.

Regarding both S-HS and D-HS instrumentation, the most recent advances are generally aimed at the development of miniaturized systems or devices for faster, more sensitive determinations. However, their use is still limited and is far from general implementation for routine analysis. The same applies to the large number of applications describing the coupling of HS sampling to 2D-GC techniques that have emerged in the past decade. We expect that the ongoing progress on data handling and quantitation in GC × GC will shortly contribute to exploit fully the potential of coupling both techniques for the analysis of complex mixtures of volatiles in real samples.

Finally, and in line with the current development of non-separative methods and of data-handling strategies, we expect that HS-MS methodologies will continue to be developed for rapid, unbiased sample characterization and classification for different purposes.

Acknowledgements

This work has been funded by Ministerio de Economía y Competitividad (project CTQ2012-32957), Junta de Andalucía (project AGR-7626) and Fundación Ramón Areces. The authors are also thankful for the financial support from Comunidad Autónoma de Madrid and European funding from FEDER program (project S2013/ABI-3028, AVANSECAL). A.C.S. thanks Ministerio de Economía y Competitividad of Spain for a Ramón y Cajal contract.

References

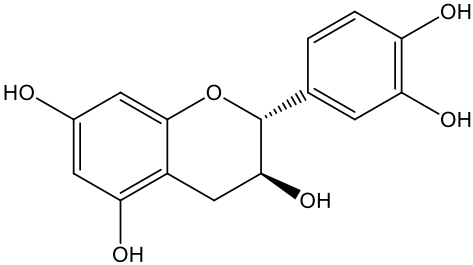
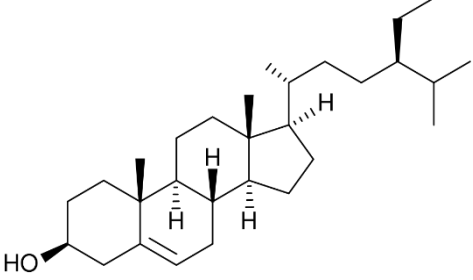
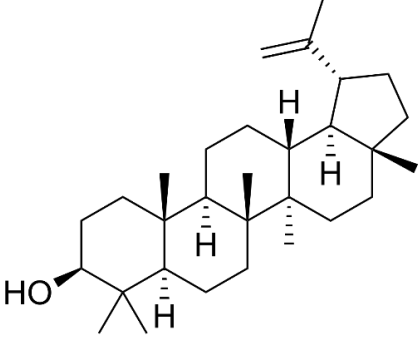
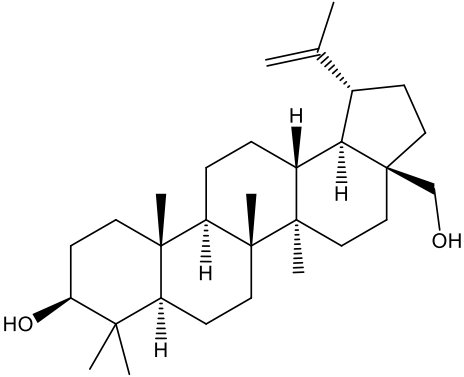
- [1] G. Romanik, E. Gilgenast, A. Przyjazny, M. Kaminski, Techniques for preparing plant material for chromatographic separation and analysis, *J. Biochem. Biophys. Methods* 70 (2007) 253–261.
- [2] A. Mustafa, C. Turner, Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: a review, *Anal. Chim. Acta* 703 (2011) 8–18.
- [3] J. Azmir, I.S.M. Zaidul, M.M. Rahman, K.M. Sharif, A. Mohamed, F. Sahena, et al., Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review, *J. Food Eng.* 117 (2013) 426–436.
- [4] B. Kolb, L.S. Ettre, *Static Headspace-Gas Chromatography, Theory and Practice*, 1st ed., Wiley – VCH, New York, 1997.
- [5] C. Bicchì, C. Cordero, E. Liberto, B. Sgorbini, P. Rubiolo, Headspace sampling of the volatile fraction of vegetable matrices, *J. Chromatogr. A* 1184 (2008) 220–233.
- [6] L.M. Carvalho, F. Carvalho, M.L. Bastos, P. Baptista, N. Moreira, A.R. Monforte, et al., Non-targeted and targeted analysis of wild toxic and edible mushrooms using gas chromatography-ion trap mass spectrometry, *Talanta* 118 (2014) 292–303.
- [7] I. Šrámková, B. Horstkotte, P. Solich, H. Sklenářová, Automated in-syringe single-drop head-space micro-extraction applied to the determination of ethanol in wine samples, *Anal. Chim. Acta* 828 (2014) 53–60.
- [8] I. San Román, M.L. Alonso, I. Bartolomé, R.M. Alonso, R. Fañanás, Analytical strategies based on multiple headspace extraction for the quantitative analysis of aroma components in mushrooms, *Talanta* 123 (2014) 207–217.
- [9] N.H. Snow, G.P. Bullock, Novel techniques for enhancing sensitivity in static headspace extraction-gas chromatography, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2726–2735.
- [10] A. Sarafraz-Yazdi, H. Vatani, A solid phase microextraction coating based on ionic liquid sol-gel technique for determination of benzene, toluene, ethylbenzene and o-xylene in water samples using gas chromatography flame ionization detector, *J. Chromatogr. A* 1300 (2013) 104–111.
- [11] H. Sheikhoie, M. Saber-Tehrani, P. Abramand-Azar, S. Waqif-Husain, Analysis of tributyltin and triphenyltin in water by ionic liquid-headspace single-drop microextraction then HPLC with fluorimetric detection, *Acta Chromatogr.* 21 (2009) 577–589.
- [12] I.D. Fisk, M. Boyer, R.S.T. Linforth, Impact of protein, lipid and carbohydrate on the headspace delivery of volatile compounds from hydrating powders, *Eur. Food Res. Technol.* 235 (2012) 517–525.
- [13] A.M. Seuvre, E. Philippe, S. Rochard, A. Voilley, Retention of aroma compounds in food matrices of similar rheological behavior and different compositions, *Food Chem.* 96 (2006) 104–114.
- [14] V. Samavati, Z. Emam-Djomeh, A. Mehdinia, Thermodynamic and kinetic study of volatile compounds in biopolymer based dispersions, *Carbohydr. Polym.* 99 (2014) 556–562.
- [15] G. Laus, M. Andre, G. Bentivoglio, H. Schottenberger, Ionic liquids as superior solvents for headspace gas chromatography of residual solvents with very low vapor pressure, relevant for pharmaceutical final dosage forms, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6020–6023.
- [16] L.A. Frink, C.A. Weatherly, D.W. Armstrong, Water determination in APIs using ionic liquid headspace gas chromatography and two different detection protocols, *J. Pharmaceut. Biomed.* 94 (2014) 111–117.
- [17] T.D. Ho, P.M. Yehl, N.P. Chetwyn, J. Wang, J.L. Anderson, Q. Zhong, Determination of trace level genotoxic impurities in small molecule drug substances using conventional headspace gas chromatography with contemporary ionic liquid diluents and electron capture detection, *J. Chromatogr. A* 1361 (2014) 217–228.
- [18] Z. Güler, F. Karaca, H. Yetisir, Volatile compounds and sensory properties in various melons, which were chosen from different species and different locations, grown in Turkey, *Int. J. Food Prop.* 16 (2013) 168–179.
- [19] M. Ligor, B. Buszewski, The comparison of solid phase microextraction-GC and static headspace-GC for determination of solvent residues in vegetable oils, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 364–371.
- [20] D. Sanjuán-Herráez, I. Lliso, A. Pastor, M. de la Guardia, Green determination of the presence of volatile organic compounds in vehicle repair shops through passive sampling, *Talanta* 98 (2012) 40–48.
- [21] J.C. Flórez Menéndez, M.L. Fernández Sánchez, E. Fernández Martínez, J.E. Sánchez Uría, A. Sanz-Méndel, Static headspace versus head space solid-phase microextraction (HS-SPME) for the determination of volatile organochlorine compounds in landfill leachates by gas chromatography, *Talanta* 63 (2004) 809–814.
- [22] O. Yilmazcan, E.T. Ozer, B. Izgi, S. Gucer, Optimization of static Head-space Gas Chromatography – Mass Spectrometry conditions for the determination of benzene, toluene, ethyl benzene, xylene, and styrene in model solutions, *Ekoloji* 22 (2013) 76–83.
- [23] M. del Nosal Sánchez, P. Glanzer, J.L. Pérez Pavón, C. García Pinto, B.M. Cordero, Determination of antioxidants in new and used lubricant oils by headspace-programmed temperature vaporization-gas chromatography-mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 3215–3224.
- [24] C. Tessini, N. Müller, C. Mardones, D. Meier, A. Berg, D. von Baer, Chromatographic approaches for determination of low-molecular mass aldehydes in bio-oil, *J. Chromatogr. A* 1219 (2012) 154–160.
- [25] A. Pérez-Antón, A.M. Casas-Ferreira, C. García Pinto, B. Moreno-Cordero, J.L. Pérez-Pavón, Headspace automation coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the automated determination and quantification of

- endogenous compounds in urine. Aldehydes as possible markers of oxidative stress, *J. Chromatogr. A* 1367 (2014) 9–15.
- [26] N.H. Snow, C.G. Slack, Head-space analysis in modern gas chromatography, *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 608–617.
- [27] European Pharmacopeia 8.0, *Methods of Analysis: Identification and Control of Residual Solvents*, vol. 1, 2014, section 2.4.24.
- [28] S. Klick, A. Sköld, Validation of a generic analytical procedure for determination of residual solvents in drug substances, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004) 401–409.
- [29] C. Cheng, S. Liu, B.J. Mueller, Z. Yan, A generic static headspace gas chromatography method for determination of residual solvents in drug substance, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 6413–6421.
- [30] W. D'Autry, C. Zheng, J. Bugalama, K. Wolfs, J. Hoogmartens, E. Adams, et al., Liquid paraffin as new dilution medium for the analysis of high boiling point residual solvents with static headspace-gas chromatography, *J. Pharmaceut. Biomed.* 55 (2011) 1017–1023.
- [31] K. Urakami, A. Higashi, K. Umemoto, M. Godo, Matrix media selection for the determination of residual solvents in pharmaceuticals by static headspace gas chromatography, *J. Chromatogr. A* 1057 (2004) 203–210.
- [32] X. He, Y. Jiang, L. Lei, J. Li, M. Ni, Quantitative prediction of ionic liquid-gas partition coefficients for residual solvents by HS-GC, *Chromatographia* 74 (2011) 157–161.
- [33] J. Somuramasami, Y.C. Wei, E.F. Soliman, A.M. Rustum, Static headspace gas chromatographic method for the determination of low and high boiling residual solvents in betamethasone valerate, *J. Pharmaceut. Biomed.* 54 (2011) 242–247.
- [34] A. Mornar, M. Sertic, B. Nigovic, Quality assessment of liquid pharmaceutical preparations by HSS-GC-FID, *J. Anal. Chem.* 68 (2013) 1076–1080.
- [35] J.L. Pérez-Pavón, M. del Nogal Sánchez, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, Determination of fibertone in spiked olive oil samples using headspace-programmed temperature vaporization-gas chromatography-mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 1463–1470.
- [36] D. Sanjuán-Herráez, S. de la Osa, A. Pastor, M. de la Guardia, Air monitoring of selected volatile organic compounds in wineries using passive sampling and headspace-gas chromatography-mass spectrometry, *Microchem. J.* 114 (2014) 42–47.
- [37] J.L. Pérez Pavón, A.M. Casas Ferreira, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, In situ derivatization reaction and determination of ibuprofen in water samples using headspace generation-programmed temperature vaporization-gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6728–6734.
- [38] A.M. Casas-Ferreira, M.E. Fernández-Laespada, J.L. Pérez-Pavón, B. Moreno-Cordero, Headspace sampling with *in situ* carbodiimide-mediated derivatization for the determination of ibuprofen in water samples, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4856–4862.
- [39] J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, Simultaneous determination of gasoline oxygenates and benzene, toluene, ethylbenzene and xylene in water samples using headspace-programmed temperature vaporization-fast gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1175 (2007) 106–111.
- [40] D.M. Levermore, M. Josowicz, W.S. Rees Jr., J. Janata, Headspace analysis of engine oil by gas chromatography/mass spectrometry, *Anal. Chem.* 73 (2001) 1361–1365.
- [41] M. Gröning, M. Hakkarainen, A.C. Albertsson, Quantitative determination of volatiles in polymers and quality control of recycled materials by static headspace techniques, *Adv. Polym. Sci.* 211 (2008) 51–84.
- [42] ASTM, D 4526 – determination of volatiles in polymers by static headspace gas chromatography, 2012.
- [43] B. Kolb, L.S. Ettre, Theory and practice of multiple headspace extraction, *Chromatographia* 32 (1991) 505–513.
- [44] A.C. Soria, I. Martínez-Castro, J. Sanz, Estimation of recovery by multistep purge-and-trap gas chromatographic-mass spectrometric analysis of honey volatiles, *J. Chromatogr. A* 1157 (2007) 430–436.
- [45] P.R. Lozano, M. Drake, D. Benitez, K.R. Cadwallader, Instrumental and sensory characterization of heat-induced odorants in aseptically packaged soy milk, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 3018–3026.
- [46] J. Liu, T.B. Toldam-Andersen, M.A. Petersen, S.J. Zhang, N. Arneborg, W.L.P. Bredie, Instrumental and sensory characterisation of Solaris white wines in Denmark, *Food Chem.* 166 (2015) 133–142.
- [47] M. Lakatos, Measurement of residual solvents in a drug substance by a purge-and-trap method, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47 (2008) 954–957.
- [48] M. Povoio, G. Contarini, Comparison of solid-phase microextraction and purge-and-trap methods for the analysis of the volatile fraction of butter, *J. Chromatogr. A* 985 (2003) 117–225.
- [49] J. Sanz, A.C. Soria, M.C. García-Vallejo, Analysis of volatile components of *Lavandula luisieri* L. by direct thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1024 (2004) 139–146.
- [50] Y.C. Su, W.T. Liu, W.C. Liao, S.W. Chiang, J.L. Wang, Full-range analysis of ambient volatile organic compounds by a new trapping method and gas chromatography/mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 5733–5742.
- [51] E. Valero, E. Miranda, J. Sanz, I. Martínez-Castro, Automatic thermal desorption in GC analysis of dairy product volatiles, *Chromatographia* 44 (1997) 59–64.
- [52] A.C. Soria, I. Martínez-Castro, J. Sanz, Some aspects of dynamic headspace analysis of volatile components in honey, *Food Res. Int.* 41 (2008) 838–848.
- [53] A.C. Soria, I. Martínez-Castro, J. Sanz, Study of precision in the purge-and-trap-gas chromatography-mass spectrometry analysis of volatile compounds in honey, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 3300–3304.
- [54] C.F. Ross, *Headspace analysis*, in: J. Pawliszyn (Editor), *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, Elsevier, 2012, pp. 27–50.
- [55] A. Rivas-Cañedo, C. Juez-Ojeda, M. Nuñez, E. Fernández-García, Volatile compounds in ground beef subjected to high pressure processing: a comparison of dynamic headspace and solid-phase microextraction, *Food Chem.* 124 (2011) 1201–1207.
- [56] C. Murat, K. Gourrat, H. Jerosch, N. Cayot, Analytical comparison and sensory representativity of SAFE, SPME and Purge and Trap extracts of volatile compounds from pea flour, *Food Chem.* 135 (2012) 913–920.
- [57] G. Cao, Q. Li, J. Zhang, H. Cai, B. Cai, A purge and trap technique to capture volatile compounds combined with comprehensive two-dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry to investigate the effect of sulfur-fumigation on *Radix Angelicae Dahuricae*, *Biomed. Chromatogr.* 28 (2014) 1167–1172.
- [58] S. Mallia, E. Fernández-García, J. Olivier Bosset, Comparison of purge and trap and solid phase microextraction techniques for studying the volatile aroma compounds of three European PDO hard cheeses, *Int. Dairy J.* 15 (2005) 741–758.
- [59] S. Manzini, C. Durante, C. Baschieri, M. Cocchi, S. Sighinolfi, S. Totaro, et al., Optimization of a dynamic headspace-thermal desorption-gas chromatography/mass spectrometry procedure for the determination of furfurals in vinegars, *Talanta* 85 (2011) 863–869.
- [60] F. Ruiz-Bevia, M.J. Fernández-Torres, M.P. Blasco-Alemay, Purge efficiency in the determination of trihalomethanes in water by purge-and-trap gas chromatography, *Anal. Chim. Acta* 632 (2009) 304–314.
- [61] A. Ikem, Measurement of volatile organic compounds in bottled and tap waters by purge and trap GC-MS: are drinking water types different?, *J. Food Compos. Anal.* 23 (2010) 70–77.
- [62] H. Pietilä, P. Peñämäki, J. Piispanen, L. Majuri, M. Starr, T. Nieminen, et al., Determination of methyl mercury in humic-rich natural water samples using N₂-distillation with isotope dilution and on-line purge and trap GC-ICP-MS, *Microchem. J.* 112 (2014) 113–118.
- [63] S. Herrera López, M.J. Gómez, M.D. Hernando, A.R. Fernández-Alba, Automated dynamic headspace followed by a comprehensive two-dimensional gas chromatography full can time-of-flight mass spectrometry method for screening of volatile organic compounds (VOCs) in water, *Anal. Methods* 5 (2013) 1165–1177.
- [64] X. Deng, P. Xie, M. Qi, G. Liang, J. Chen, Z. Ma, et al., Microwave assisted purge-and-trap extraction device coupled with gas chromatography and mass spectrometry for the determination of five predominant odors in sediment, fish tissues, and algal cells, *J. Chromatogr. A* 1219 (2012) 75–82.
- [65] M.J. Prieto, D. Marhuenda, A. Cardona, Analysis of styrene and its metabolites in blood and urine of workers exposed to both styrene and acetone, *J. Anal. Toxicol.* 26 (2002) 23–28.
- [66] V. De Preter, G. Van Staeyen, D. Esser, P. Rutgeerts, K. Verbeke, Development of a screening method to determine the pattern of fermentation metabolites in fecal samples using on-line purge-and-trap gas chromatography-mass spectrometric analysis, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1476–1483.
- [67] A. Salemi, S. Lacorte, H. Bagheri, D. Barceló, Automated trace determination of earthy-musty odorous compounds in water samples by on-line purge-and-trap-gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1136 (2006) 170–175.
- [68] B.L. Yuan, F. Li, D.M. Xu, M.L. Fu, Comparison of two methods for the determination of geosmin and 2-methylisoborneol in algae samples by stable isotope dilution assay through purge-and-trap or headspace solid-phase microextraction combined with GC/MS, *Anal. Methods* 5 (2013) 1739–1746.
- [69] S. Massolo, P. Rivo, R. Frache, Simultaneous determination of CFC-11, CFC-12 and CFC-113 in seawater samples using a purge and trap gas-chromatographic system, *Talanta* 80 (2009) 959–966.
- [70] I. Ueta, N. Abd Razak, A. Mizuguchi, S. Kawakubo, Y. Saito, K. Jinno, Needle-type extraction device for the purge and trap analysis of 23 volatile organic compounds in tap water, *J. Chromatogr. A* 1317 (2013) 211–216.
- [71] M. Akbar, S. Narayanan, M. Restaino, M. Agah, A purge and trap integrated microGC platform for chemical identification in aqueous samples, *Analyst* 139 (2014) 3384–3392.
- [72] Z. Zhong, G. Li, Z. Luo, B. Zhu, Multi-channel purge and trap system coupled with ion chromatography for the determination of alkylamines in cosmetics, *Anal. Chim. Acta* 715 (2012) 49–56.
- [73] A.N. Birch, A.S. Hansen, M.A. Petersen, Multiple headspace extraction—an effective method to quantify aroma compounds in bread crumb, in: V. Ferreira, R. Lopez (Editors), *Flavour Science*, Elsevier, 2014, pp. 379–383.
- [74] C. Bicchi, M.R. Ruosi, C. Cagliero, C. Cordero, E. Liberto, P. Rubiolo, et al., Quantitative analysis of volatiles from solid matrices of vegetable origin by high concentration capacity headspace techniques: determination of furan in roasted coffee, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 753–762.
- [75] X.S. Chai, F.J. Schork, A. DeCinque, Simplified multiple headspace extraction gas chromatographic technique for determination of monomer solubility in water, *J. Chromatogr. A* 1070 (2005) 225–229.
- [76] C. Pérès, F. Begnaud, L. Eveleigh, J.-L. Berdagué, Fast characterization of foodstuff by headspace mass spectrometry (HS-MS), *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 858–866.
- [77] F. Peña, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel, Direct olive oil authentication: detection of adulteration of olive oil with hazelnut oil by direct coupling of

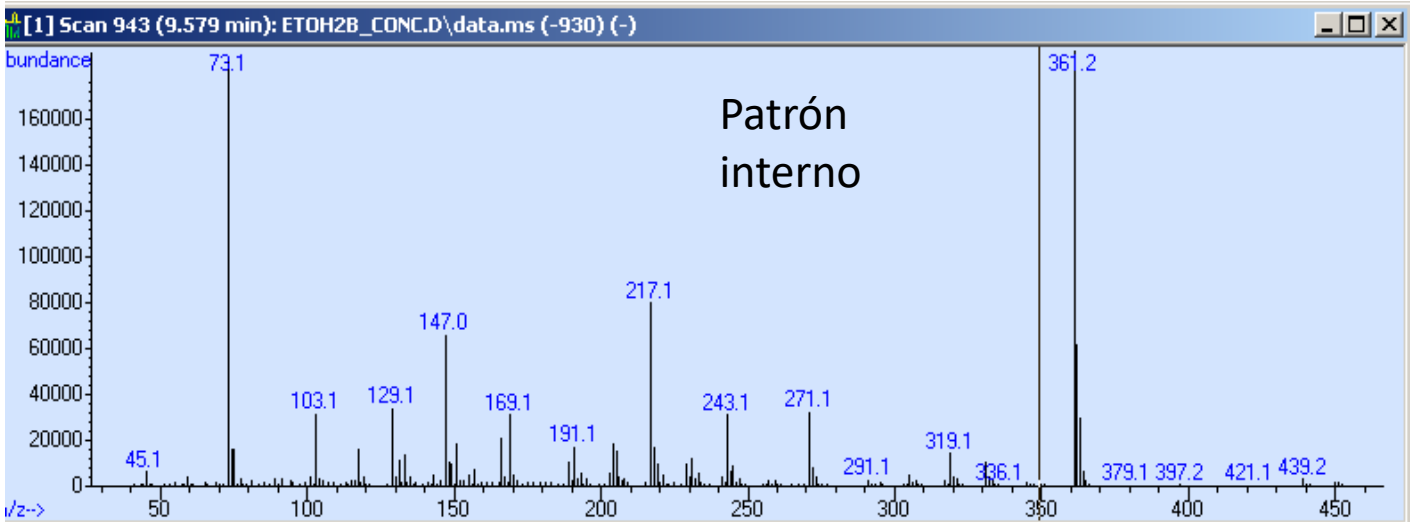
- headspace and mass spectrometry, and multivariate regression techniques, *J. Chromatogr. A* 1074 (2005) 215–221.
- [78] S. López-Feria, S. Cárdenas, J.A. García-Mesa, M. Valcárcel, Usefulness of the direct coupling headspace-mass spectrometry for sensory quality characterization of virgin olive oil samples, *Anal. Chim. Acta* 583 (2007) 411–417.
- [79] D. Cozzolino, H.E. Smyth, W. Cynkar, L. Janik, R.G. Damberg, M. Gishen, Use of direct headspace-mass spectrometry coupled with chemometrics to predict aroma properties in Australian Riesling wine, *Anal. Chim. Acta* 621 (2008) 2–7.
- [80] J. Gamboa-Santos, A.C. Soria, M. Pérez-Mateos, J.A. Carrasco, A. Montilla, M. Villamiel, Vitamin C content and sensorial properties of dehydrated carrots blanched conventionally or by ultrasound, *Food Chem.* 136 (2013) 782–788.
- [81] J.W.T. Yates, M.J. Chappell, J.W. Gardner, C.S. Dow, C. Dowson, A. Hamood, et al., Data reduction in headspace analysis of blood and urine samples for robust bacterial identification, *Comput. Methods Programs Biomed.* 79 (2005) 259–271.
- [82] A. Serrano, M. Gallego, Rapid determination of total trihalomethanes index in drinking water, *J. Chromatogr. A* 1154 (2007) 26–33.
- [83] R.A. Ketola, T. Kotiaho, E. Cisper, T.M. Allen, Environmental applications of membrane introduction mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 37 (2002) 457–476.
- [84] M.A. Mendes, R. Sparrapan, M.N. Eberlin, Headspace membrane introduction mass spectrometry for trace level analysis of VOCs in soil and other solid matrixes, *Anal. Chem.* 72 (2000) 2166–2170.

ANEXO II

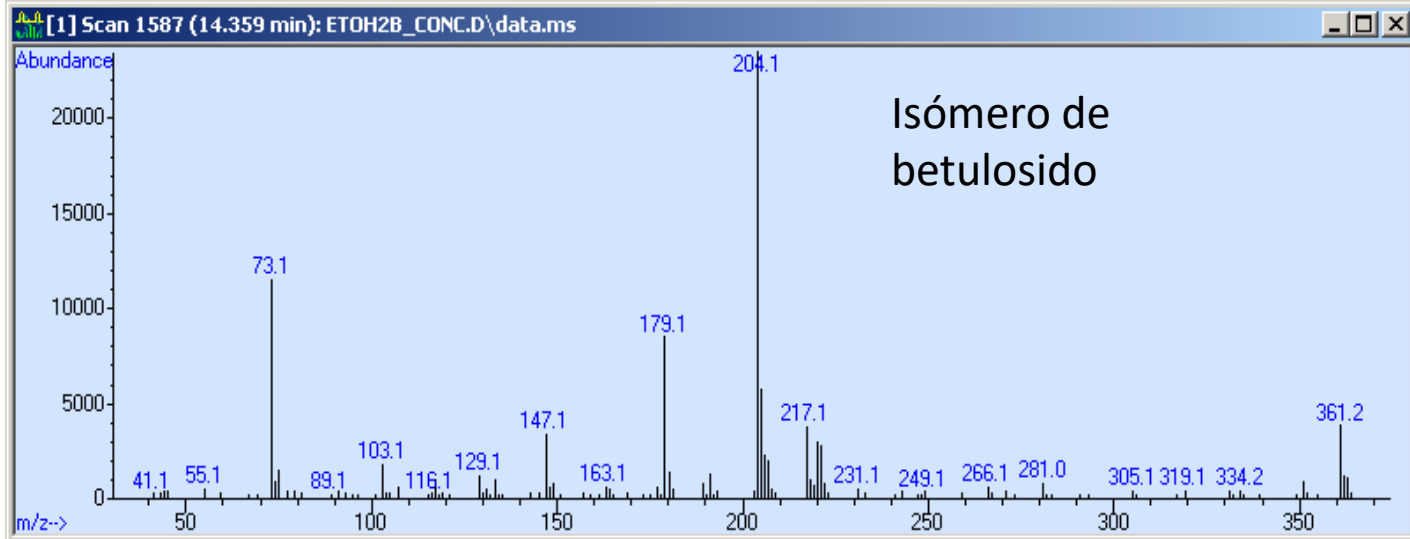
Fructosa	
Glucosa	
Myo-inositol	
Ácido decanoico	
Sacarosa	
Ácido betulínico	

<p>Catequina</p>	 <p>The chemical structure of Catequina (epigallocatechin gallate) is shown. It consists of a central chromane ring system. The 2-position of the chromane ring is substituted with a gallic acid moiety (a benzene ring with three hydroxyl groups at the 2, 3, and 4 positions). The 3-position of the chromane ring is substituted with a hydroxyl group. The 7-position of the chromane ring is substituted with a hydroxyl group.</p>
<p>β-sitosterol</p>	 <p>The chemical structure of β-sitosterol is shown. It is a steroid with a hydroxyl group at the 3-position, a double bond between C5 and C6, and a side chain at C17 consisting of an ethyl group and an isopropyl group.</p>
<p>Lupeol</p>	 <p>The chemical structure of Lupeol is shown. It is a pentacyclic triterpene with a hydroxyl group at the 3-position and a side chain at C13 consisting of a methyl group and a dimethylallyl group.</p>
<p>Betulina</p>	 <p>The chemical structure of Betulina is shown. It is a pentacyclic triterpene with a hydroxyl group at the 3-position and a side chain at C13 consisting of a methyl group and a dimethylallyl group.</p>

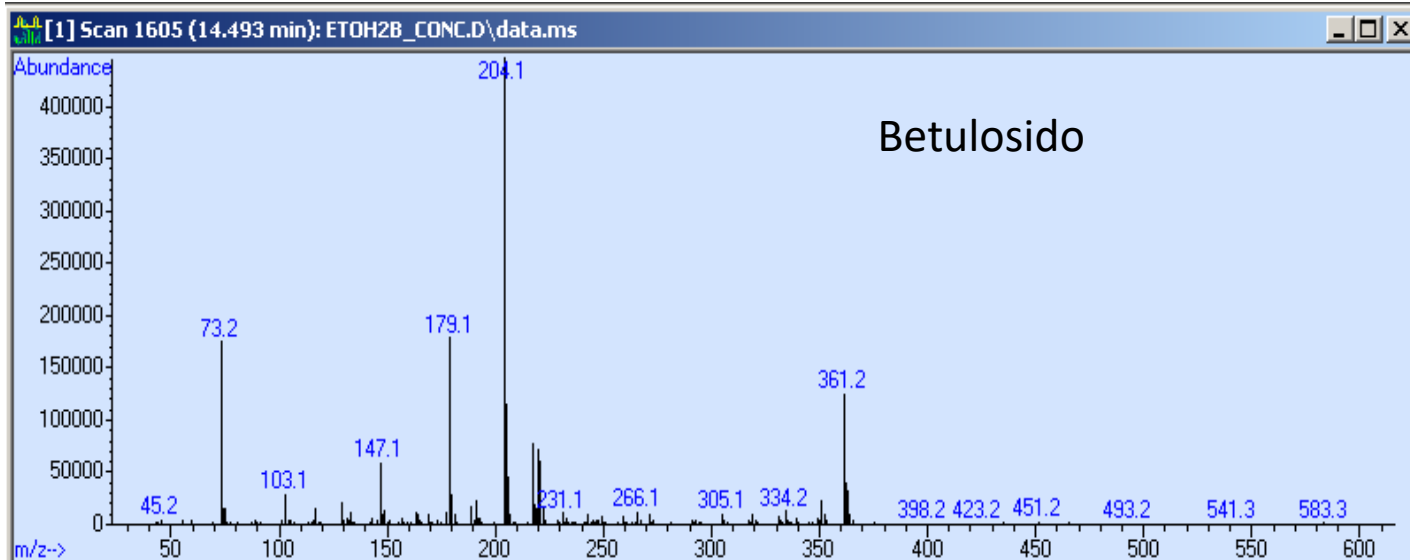
9.58 min: Patrón Interno



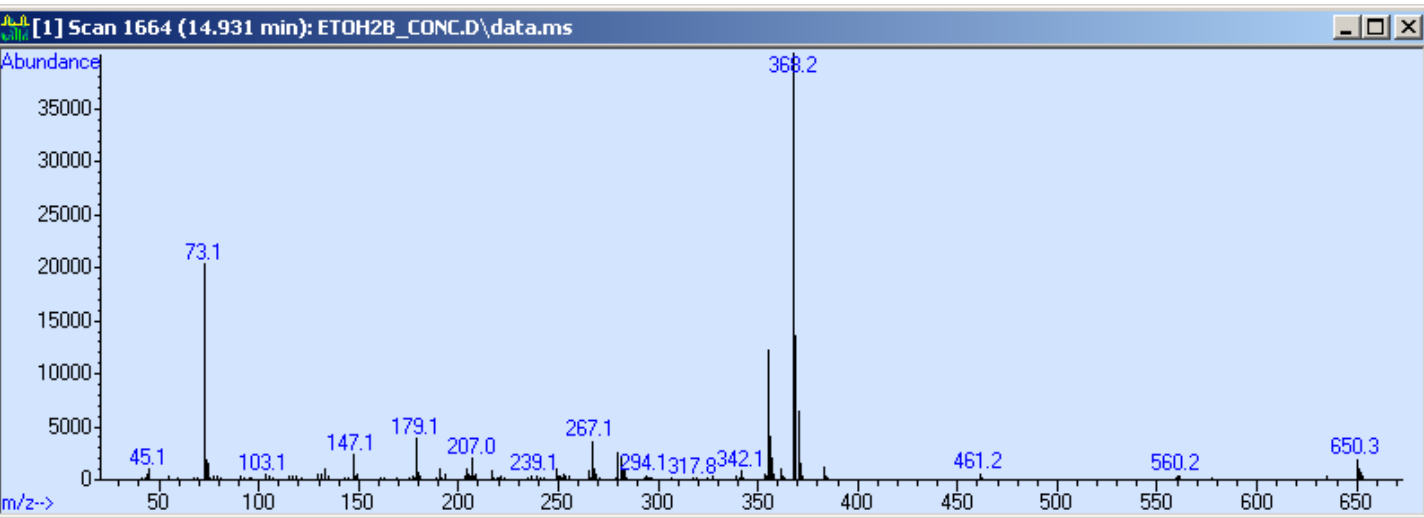
14.36 min: Isómero de betulosido



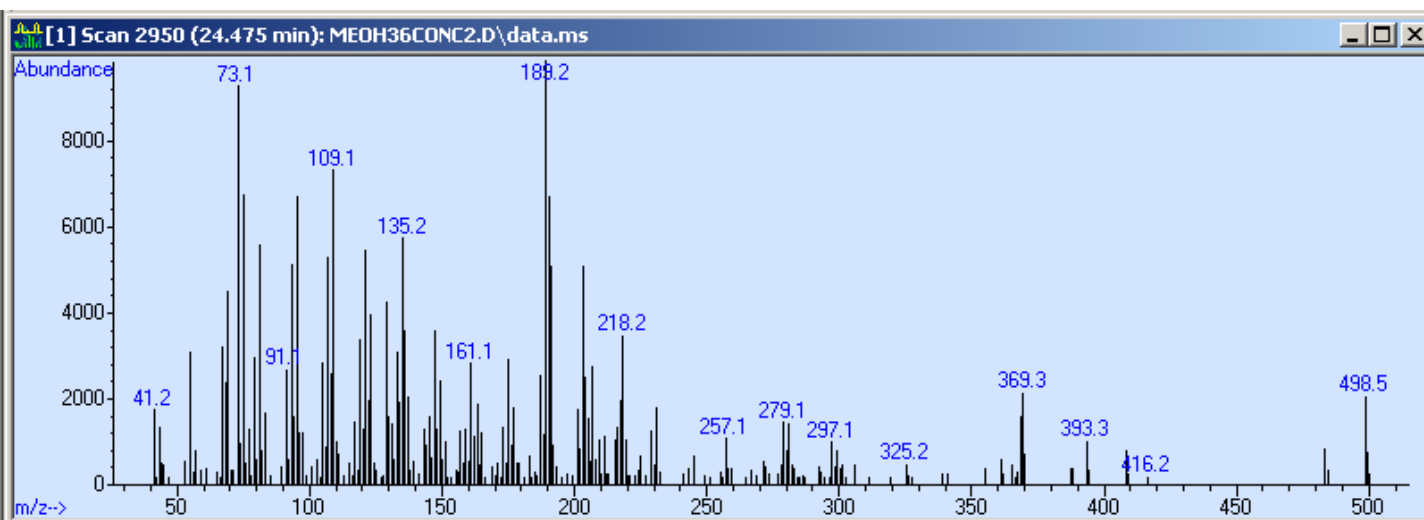
14.49 min: Betulosido



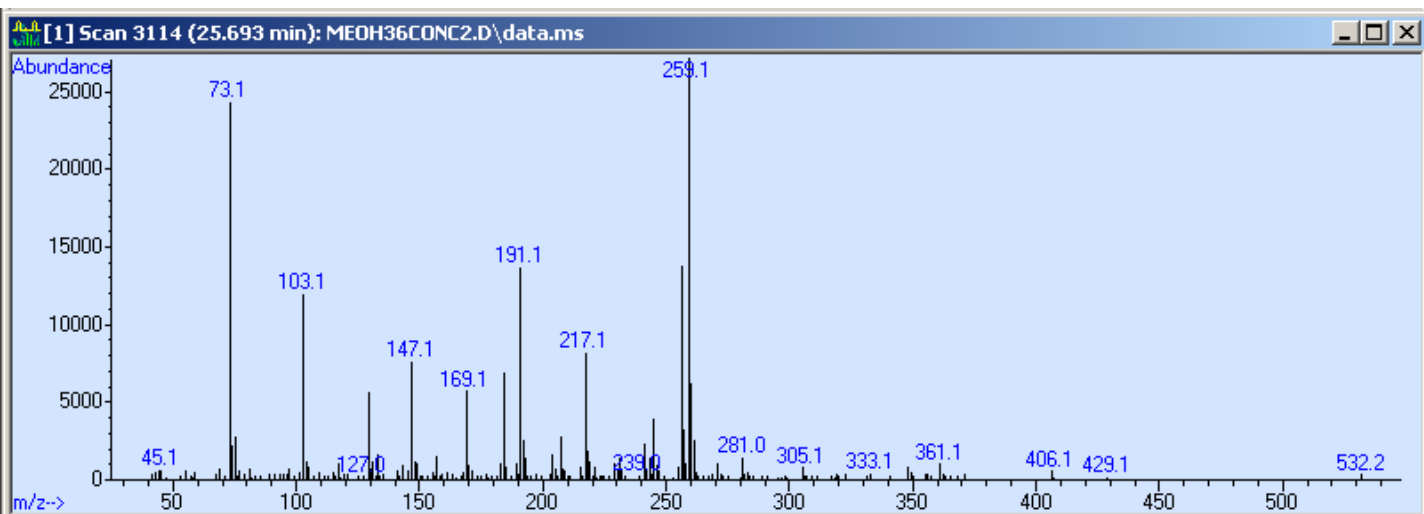
14.96 min: Catequina



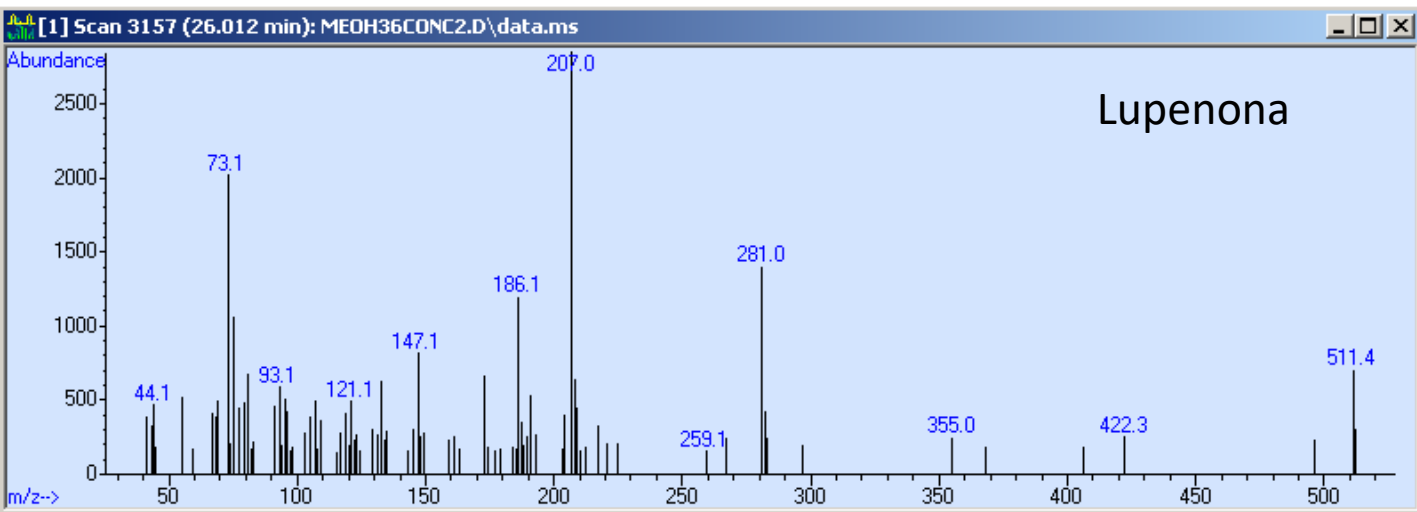
24.48 min (MeOH36_CONC2): Lupeol



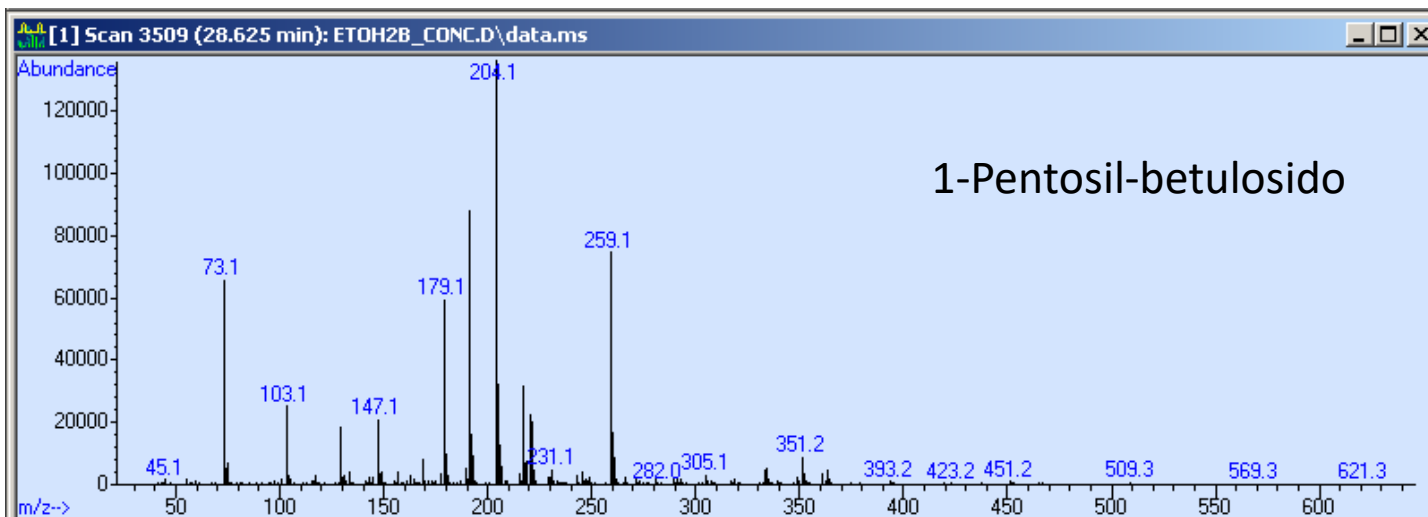
25.70 min (MeOH36_CONC2): 1-Pentasil derivado de glicosido



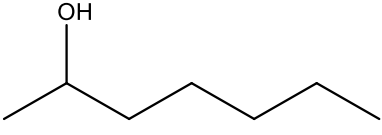
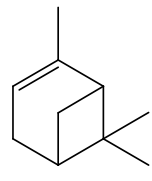
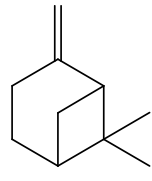
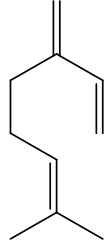
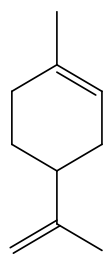
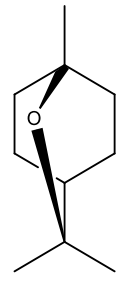
26.012min: Lupenona

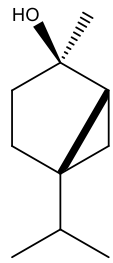
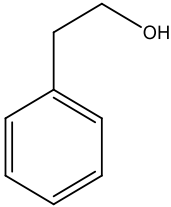
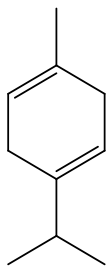
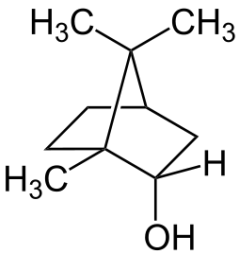
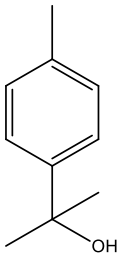


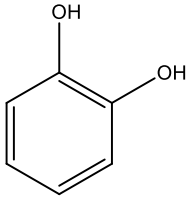
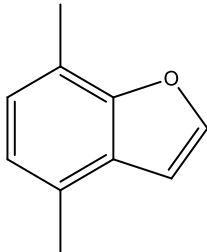
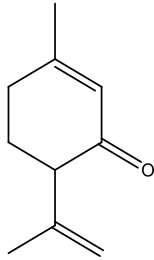
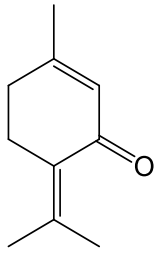
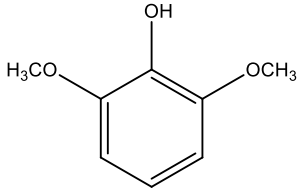
29.122 min: 1-Pentosil-betulosido

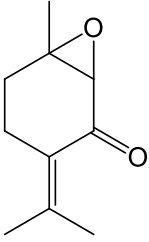
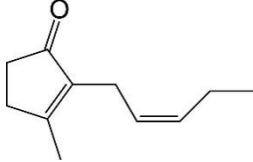
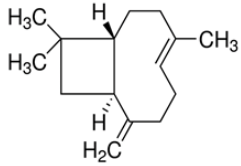
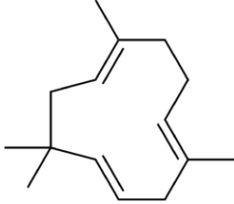
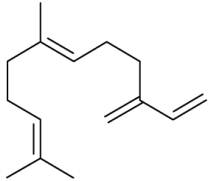


ANEXO IV

Pico N°.	Compuesto	Estructura
3	2-Heptanol	
4	α -Pino	
6	β -Pino	
7	β -Mirceno	
9	Limoneno	
10	1,8-Cineol	

12	Hidrato <i>cis</i> -sabineno	
15	2-Feniletanol	
17	α -Terpineol	
18	<i>endo</i> -Borneol	
19	<i>p</i> -Cimen-8-ol	

21	1,2-Bencenodiol	
22	4,7-Dimetilbenzofurano	
24	Isopiperitenona	
26	Piperitenona	
27	2,6-Dimetoxifenol	

28	Óxido de piperitenona	
31	<i>cis</i> -Jasmona	
33	<i>trans</i> -Cariofileno	
35	α -Humuleno	
36	β -Farneseno	
39	γ -Cadineno	