

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ingeniería Agroalimentaria y del
Medio Rural

Industrias Agrarias y Alimentarias

Extracción de especies vegetales para la obtención
de extractos con propiedades antifúngicas y
antioxidantes, de interés en la industria alimentaria

Extraction of plant species to obtain extracts with
antifungal and antioxidant properties, of interest to
the food industry

Autor

Clara Abad Altelarrea

Directores

Juliana Navarro Rocha
David Gimeno Martínez

Ponente

María Eugenia Venturini Crespo

ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR
2023

Declaración expresa de autoría

“El Trabajo de Fin de Grado que presento para su exposición y defensa es original y todas las fuentes utilizadas para su realización han sido debidamente citadas en el mismo”

Firmado por la alumna

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and lines, positioned below the text 'Firmado por la alumna'.

ÍNDICE

1.	RESUMEN Y ABSTRACT	9
1.1	RESUMEN	9
1.2	ABSTRACT	9
2	INTRODUCCIÓN.....	10
2.1	PLANTAS AROMÁTICAS Y MEDICINALES.....	11
2.2	FACTORES INFLUYENTES EN LAS PROPIEDADES Y LA PRODUCCIÓN DE LAS PLANTAS AROMÁTICAS	15
2.3	EXTRACTOS Y ACEITES ESENCIALES	16
2.4	MÉTODOS CONVENCIONALES Y NUEVAS TECNOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN.....	19
2.4.1	Extracción Soxhlet	20
2.4.2	Extracción Soxhlet asistida por microondas y ultrasonidos	21
2.4.3	Extracción mediante fluidos supercríticos (SFE)	22
2.4.4	Extracción con fluidos presurizados (PLE).....	23
2.4.5	Pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV)	24
2.5	OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN	25
2.6	PROPIEDADES DE LAS PLANTAS AROMÁTICAS.....	27
2.6.1	Propiedades antimicrobianas	28
2.6.2	Propiedades insecticidas	29
2.6.3	Propiedades antioxidantes	29
2.7	USOS Y APLICACIONES DE LOS EXTRACTOS EN LA INDUSTRIA	30
3.	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	34
4.	MATERIAL Y MÉTODOS	36
4.1.	MATERIAL VEGETAL	36
4.2.	REACTIVOS EMPLEADOS.....	37
4.3.	OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS A PARTIR DE LAS ESPECIES VEGETALES SELECCIONADAS	37
4.3.1	Método de extracción.....	37

4.3.2	Evaporación.....	38
4.3.3	Liofilización	39
4.4.	DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS DE INTERÉS.....	40
4.4.1	Determinación del rendimiento.....	40
4.4.2	Preparación de la muestra para la cuantificación de los compuestos de interés.....	41
4.4.3	Determinación de la capacidad antioxidante	41
4.4.4	Determinación del contenido de fenoles totales	42
4.5.	OPTIMIZACIÓN DE DIFERENTES PARÁMETROS DE LA EXTRACCIÓN ..	43
4.5.1	Diseño experimental para la optimización de la extracción mediante la metodología de superficie respuesta	43
4.5.2	Influencia de las variables independientes en el proceso de extracción, análisis estadístico y validación de la optimización	45
4.6.	EVALUACIÓN IN VITRO DE LA CAPACIDAD ANTIFÚNGICA	46
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
5.1	OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN	50
5.1.1	Influencia de las condiciones de extracción estudiadas y optimización de las mismas para obtener extractos bioactivos de la especie <i>Salvia rosmarinus</i>	50
5.1.2	Influencia de las condiciones de extracción estudiadas y optimización de las mismas para obtener extractos bioactivos de la especie <i>Thymus mastichina</i>	58
5.1.3	Influencia de las condiciones de extracción estudiadas y optimización de las mismas para obtener extractos bioactivos de la especie <i>Juniperus communis</i>	66
5.2	EVALUACIÓN IN VITRO DE LA CAPACIDAD ANTIFÚNGICA	74
6.	CONCLUSIONES	77
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	79

ÍNDICE FIGURAS

Figura 2.1. Superficie en hectáreas y la producción en toneladas en el año 2021 de cultivos industriales de plantas aromáticas, medicinales y condimentarias (MAPA, 2021a).	12
Figura 2.2. Extractor Soxhlet (López-Bascón y Luque de Castro, 2020).	20
Figura 2.3. Extracción Soxhlet asistida por ultrasonidos (A y B) y por microondas (C). (A) Extracción Soxhlet asistida por ultrasonidos donde el generador se encuentra en un baño que rodea la zona de extracción (4). (B) Extracción Soxhlet asistida por ultrasonidos generados directamente en la zona de extracción (4) (López-Bascón y Luque de Castro, 2020).	21
Figura 2.4. Esquema de un sistema de PLE (Arsad et al, 2014).	23
Figura 2.5. Esquema del proceso de extracción mediante pulsos eléctricos (Jaime Gato, 2021).	24
Figura 2.6. Diseño Box-Behnken con 3 factores (Mojaddam y Pullen, 2019).	27
Figura 4.1. Equipo de extracción Soxhlet de seis puestos.	37
Figura 4.2. Evaporador rotativo empleado para la evaporación de los extractos vegetales.	38
Figura 4.3. Liofilizador (Telstar; Terassa, España) empleado para la concentración de los extractos.	39
Figura 4.4. Aspecto de las bandejas previas (A) y tras la etapa de liofilización.	39
Figura 4.5. Aspecto final de los extractos liofilizados.	40
Figura 4.6. Dilución del extracto liofilizado (A), filtrado (B) y extracto filtrado (C).	41
Figura 4.7. Placas de 96 pocillos con las curvas de calibración y las muestras para la determinación de la capacidad antioxidante mediante el método del DPPH.	42
Figura 4.8. Placas de 96 pocillos con las curvas de calibración y las muestras para la determinación de fenoles totales.	42
Figura 4.9. Código empleado para el diseño de Box-Behnken y la obtención de las combinaciones de las variables experimentales.	44
Figura 4.10. Representación gráfica del diseño experimental de Box-Behnken y sus variables independientes codificadas, correspondiendo x1, x2 y x3 a la concentración de disolvente, la ratio y el tiempo, respectivamente.	45

Figura 4.11. Crioviales con los diferentes inóculos empleados (A) y caldo PDB con inóculo (B).	46
Figura 4.12. Tubos de ensayo de caldo PDB con inóculo tras 5 días a 25 °C.	47
Figura 4.13. Placas sembradas con los diferentes hongos estudiados: <i>M. fructicola</i> (A), <i>A. alternata</i> (B), <i>P. expansum</i> (C), <i>P. italicum</i> (D), <i>R. stolonifer</i> (E), <i>Cladosporium</i> sp. (F), <i>G. candidum</i> (G) y <i>B. cinerea</i> (H).....	47
Figura 4.14. Recogida en placa de hongos esporulados (A) y recuperación de los esporos en un tubo de ensayo (B).	48
Figura 4.15. Esporas fúngicas observadas por microscopio óptico en una cámara de Neubauer.....	48
Figura 4.16. Diluciones y microdiluciones realizadas para un ensayo de agentes antifúngicos con modificaciones (Espinel-Ingroff y Cantón, 2007).....	49
Figura 4.17. Placa con las microdiluciones a estudiar y sus controles de crecimiento y esterilidad del extracto de la especie <i>J.communis</i>	49
Figura 5.1. Correlación entre los valores estimados y experimentales para el modelo de optimización del rendimiento (%) (A, B), el contenido de fenoles totales (mg GAE/g extracto liofilizado) (C, D) y capacidad antioxidante (mmol Trolox/g extracto liofilizado) (E, F) de <i>S. rosmarinus</i>	54
Figura 5.2. Rendimiento para la especie <i>S. rosmarinus</i> en función de la concentración de etanol a partir del modelo de extracción Soxhlet.....	55
Figura 5.3. Gráficas de superficie 3D elaboradas a partir del modelo de extracción Soxhlet para la optimización de la cantidad de fenoles totales (mg GAE/g extracto liofilizado) de la especie <i>S. rosmarinus</i> . Interacción entre la ratio de muestra y solvente y la concentración de solvente a las 2 h de extracción (A); entre el tiempo y la concentración de solvente con una ratio de 50 mL de solvente por gramo de muestra seca (B); y entre el tiempo y la ratio de muestra y solvente al 70% de etanol (C).	56
Figura 5.4. Gráficas de superficie 3D elaboradas a partir del modelo de extracción Soxhlet para la optimización de la capacidad antioxidante (mmol Trolox/g extracto liofilizado) de la especie <i>S. rosmarinus</i> . Interacción entre la ratio de muestra y solvente y la concentración de solvente a las 2 h de extracción (A); entre el tiempo y la concentración de solvente con una ratio de 50 mL de solvente por gramo de muestra seca (B); y entre el tiempo y la ratio de muestra y solvente al 70% de etanol (C).	57

Figura 5.5. Correlación entre los valores estimados y experimentales para el modelo de optimización del rendimiento (%) (A, B), el contenido de fenoles totales (mg GAE/g extracto liofilizado) (C, D) y capacidad antioxidante (mmol Trolox/g extracto liofilizado) (E, F) de *T. mastichina*..... 62

Figura 5.6. Gráficas de superficie 3D elaboradas a partir del modelo de extracción Soxhlet para la optimización del rendimiento (%) de la especie *T. mastichina*. Interacción entre la ratio de muestra y solvente y la concentración de solvente a las 2 h de extracción (A); entre el tiempo y la concentración de solvente con una ratio de 50 mL de solvente por gramo de muestra seca (B); y entre el tiempo y la ratio de muestra y solvente al 70% de etanol (C). 63

Figura 5.7. Gráficas de superficie 3D elaboradas a partir del modelo de extracción Soxhlet para la optimización de la cantidad de fenoles totales (mg GAE/g extracto liofilizado) de la especie *T. mastichina*. Interacción entre la ratio de muestra y solvente y la concentración de solvente a las 2 h de extracción (A); entre el tiempo y la concentración de solvente con una ratio de 50 mL de solvente por gramo de muestra seca (B); y entre el tiempo y la ratio de muestra y solvente al 70% de etanol (C). 64

Figura 5.8. Gráficas de superficie 3D elaboradas a partir del modelo de extracción Soxhlet para la optimización de la capacidad antioxidante (mmol Trolox/g extracto liofilizado) de la especie *T. mastichina*. Interacción entre la ratio de muestra y solvente y la concentración de solvente a las 2 h de extracción (A); entre el tiempo y la concentración de solvente con una ratio de 50 mL de solvente por gramo de muestra seca (B); y entre el tiempo y la ratio de muestra y solvente al 70% de etanol (C). 65

Figura 5.9 Correlación entre los valores estimados y experimentales para el modelo de optimización del rendimiento (%) (A, B), el contenido de fenoles totales (mg ácido gálico/g extracto liofilizado) (C, D) y capacidad antioxidante (mmol Trolox /g extracto liofilizado) (E, F) de *J. communis*. 70

Figura 5.10. Gráficas de superficie 3D elaboradas a partir del modelo de extracción Soxhlet para la optimización del rendimiento (%) de la especie *J. communis*. Interacción entre la ratio de muestra y solvente y la concentración de solvente a las 2 h de extracción (A); entre el tiempo y la concentración de solvente con una ratio de 50 mL de solvente por gramo de muestra seca (B); y entre el tiempo y la ratio de muestra y solvente al 70% de etanol (C). 71

Figura 5.11. Gráficas de superficie 3D elaboradas a partir del modelo de extracción Soxhlet para la optimización de la cantidad de fenoles totales (mg GAE/g extracto

liofilizado) de la especie *J. communis*. Interacción entre la ratio de muestra y solvente y la concentración de solvente a las 2 h de extracción (A); entre el tiempo y la concentración de solvente con una ratio de 50 mL de solvente por gramo de muestra seca (B); y entre el tiempo y la ratio de muestra y solvente al 70% de etanol (C). 72

Figura 5.12. Gráficas de superficie 3D elaboradas a partir del modelo de extracción Soxhlet para la optimización de la capacidad antioxidante (mmol Trolox/g extracto liofilizado) de la especie *J. communis*. Interacción entre la ratio de muestra y solvente y la concentración de solvente a las 2 h de extracción (A); entre el tiempo y la concentración de solvente con una ratio de 50 mL de solvente por gramo de muestra seca (B); y entre el tiempo y la ratio de muestra y solvente al 70% de etanol (C). 73

ÍNDICE TABLAS

Tabla 2.1. Solventes supercríticos y su temperatura y presión críticas (Arsad et al., 2014).	22
Tabla 2.2. Productos químicos comerciales para la protección de cultivos con extractos de plantas aromáticas en su formulación (Bhavaniramy et al., 2019).	32
Tabla 4.1. Materia vegetal empleada en este proyecto.....	36
Tabla 4.2. Parámetros empleados para la evaporación de etanol.	38
Tabla 4.3. Parámetros empleados para la liofilización de los extractos.	39
Tabla 4.4. Variables y niveles del Diseño Box-Behnken.	43
Tabla 4.5. Diseño experimental de Box-Behnken para la optimización de la extracción con las variables independientes codificadas.	44
Tabla 5.1. Diseño experimental y respuesta de las variables dependientes en la extracción de <i>S. rosmarinus</i> . Intervalo de confianza de $\alpha=0,05$, $n=3$ (Y_1) y $n=6$ (Y_2 e Y_3).	51
Tabla 5.2. ANOVA ($p<0,05$) de la regresión cuadrática múltiple para el rendimiento, cantidad de fenoles totales y capacidad antioxidante de <i>S. rosmarinus</i>	52
Tabla 5.3. Parámetros estadísticos de los modelos de optimización del rendimiento, contenido en fenoles totales y capacidad antioxidante de <i>S. rosmarinus</i>	53
Tabla 5.4. Parámetros estadísticos de los modelos de optimización del rendimiento, contenido en fenoles totales y capacidad antioxidante de <i>S. rosmarinus</i> . Intervalo de confianza de $\alpha=0,05$, $N=3$ (Y_1) y $N=6$ (Y_2 e Y_3).	58
Tabla 5.5. Diseño experimental y respuesta de las variables dependientes en la extracción de <i>T. mastichina</i> . Intervalo de confianza de $\alpha=0,05$, $N=3$ (Y_1) y $N=6$ (Y_2 e Y_3).	59
Tabla 5.6. ANOVA ($p<0,05$) de la regresión cuadrática múltiple para el rendimiento, cantidad de fenoles totales y capacidad antioxidante de <i>T. mastichina</i>	60
Tabla 5.7. Parámetros estadísticos de los modelos de optimización del rendimiento, contenido en fenoles totales y capacidad antioxidante de <i>T. mastichina</i>	61
Tabla 5.8. Parámetros estadísticos de los modelos de optimización del rendimiento, contenido en fenoles totales y capacidad antioxidante de <i>T. mastichina</i> . Intervalo de confianza de $\alpha=0,05$, $N=3$ (Y_1) y $N=6$ (Y_2 e Y_3).	66

Tabla 5.9. Diseño experimental y respuesta de las variables dependientes en la extracción de <i>J. communis</i> . Intervalo de confianza de $\alpha=0,05$, N=3 (Y1) y N=6 (Y2 e Y3).....	67
Tabla 5.10. ANOVA ($p<0,05$) de la regresión cuadrática múltiple para el rendimiento, cantidad de fenoles totales y capacidad antioxidante de <i>J. communis</i>	67
Tabla 5.11. Parámetros estadísticos de los modelos de optimización del rendimiento, contenido en fenoles totales y capacidad antioxidante de <i>J. communis</i>	69
Tabla 5.12. Parámetros estadísticos de los modelos de optimización del rendimiento, contenido en fenoles totales y capacidad antioxidante de <i>J. communis</i> . Intervalo de confianza de $\alpha=0,05$, N=3 (Y1) y N=6 (Y2 e Y3).....	74
Tabla 5.13. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y fungicida (CFM) de extractos hidroetanólicos (mg/mL) determinados por el método de la microdilución.	75

1. RESUMEN Y ABSTRACT

1.1 RESUMEN

Las plantas aromáticas y medicinales (PAM) son conocidas por sus compuestos bioactivos a los que se les atribuyen múltiples beneficios aplicables en la industria agroalimentaria, cosmética y farmacéutica.

En este trabajo se busca optimizar las condiciones para la extracción Soxhlet mediante la metodología de superficie de respuesta de tres especies de plantas aromáticas: *Salvia rosmarinus*, *Thymus mastichina* y *Juniperus communis*. Para ello se evaluaron tres variables independientes: ratio de solvente y muestra, concentración de solvente y tiempo de extracción. Las respuestas a optimizar fueron el rendimiento, el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante sobre el radical DPPH. Las condiciones óptimas que maximizaron las tres respuestas fueron de 54 mL solvente/g muestra, 61% de etanol y 3 h para *S. rosmarinus*, 51 mL solvente/g muestra, 69% etanol y 2,5 h para *T. mastichina* y 25 mL solvente/g muestra, 91% etanol y 1 h en el caso de *J. communis*.

Posteriormente, se evaluó el efecto antifúngico de concentraciones de extracto desde 0,195 hasta 100 mg/mL en diferentes hongos fitopatógenos. *T. mastichina* mostró la mayor capacidad antifúngica frente a los microorganismos estudiados, excepto para *Cladosporium* sp., para el que *S. rosmarinus* resultó más efectivo.

Palabras clave: plantas aromáticas, *Salvia rosmarinus*, *Thymus mastichina*, *Juniperus communis*, optimización, extracción, metodología superficie respuesta, actividad antifúngica.

1.2 ABSTRACT

Aromatic and medicinal plants (MAPs) are known for their bioactive compounds, which have multiple benefits useful in the agri-food, cosmetics and pharmaceutical industries.

The present study aimed to optimize the conditions for the Soxhlet extraction using the response surface methodology of three species of aromatic plants: *Salvia rosmarinus*, *Thymus mastichina* and *Juniperus communis*. The effect of three independent variables was evaluated: solvent/sample ratio, solvent concentration and extraction time. The responses to be optimized were the final yield, the content of phenolic compounds and the antioxidant capacity on the DPPH free radical. The

optimal conditions that maximized the three responses were 54 mL solvent/g sample, 61% ethanol and 3 h for *S. rosmarinus*, 51 mL solvent/g sample, 69% ethanol and 2.5 h for *T. mastichina* and 25 mL solvent/g sample, 91% ethanol and 1 h in the case of *J. communis*.

Finally, the antifungal effect of extract concentrations ranging from 0,195 to 100 mg/mL was evaluated on different phytopathogenic fungi. *T. mastichina* exhibited the highest antifungal capacity across all fungi tested, except for *Cladosporium* sp., where *S. rosmarinus* was more effective.

Keywords: aromatic plants, *Salvia rosmarinus*, *Thymus mastichina*, *Juniperus communis*, optimization, extraction, surface response methodology, antifungal activity.

2 INTRODUCCIÓN

Las plantas aromáticas se han utilizado con fines terapéuticos y medicinales desde hace miles de años, remontándose su origen a la prehistoria, alrededor de 60.000 años desde el presente (Giannenas, Sidropoulou, Bonos, Christaki y Florou-Paneri, 2021). En la actualidad, alrededor del 40% de los medicamentos recetados se encuentran formados a partir de extractos vegetales. Los extractos de las plantas aromáticas presentan propiedades antioxidantes que provocan efectos positivos sobre la salud y el envejecimiento del ser humano, además de prevenir enfermedades cardiovasculares e inflamatorias. Los principales compuestos a los que se les atribuye esta capacidad son los polifenoles (Albano y Miguel, 2011; Kontogianni et al., 2012). Además de sus propiedades antioxidantes, las plantas aromáticas se asocian con otras actividades como las antimicrobianas, antifúngicas, insecticidas y antivirales (Mutlu-Ingok, Devecioglu, Dikmetas, Karbancioglu-Guler y Capanoglu, 2020).

Las fisiopatologías vegetales provocadas por hongos resultan un problema para la agricultura y la industria alimentaria debido a la amplia variedad de especies hospedadoras, la adaptabilidad a las diferentes condiciones ambientales y su celeridad de crecimiento (Fernández-San Millán, Larraya, Farran, Ancín y Veramendi, 2021). Aproximadamente, un centenar de especies de hongos patógenos son responsables del 70-80% de las fitopatologías de frutas y vegetales (Tripathi y Dubey, 2003; Peng et al., 2021). Algunos como *Botrytis cinerea* y los géneros *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* y *Fusarium* son capaces de afectar a más de 200 especies diferentes de cultivos. Actualmente, los hongos fitopatógenos junto con sus micotoxinas son los responsables del 20% de pérdidas durante la producción y del

10% en postcosecha. Las micotoxinas que son sintetizadas por géneros como *Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus* y *Penicillium* pueden resultar letales para el ser humano y animales (Fernández-San Millán et al., 2021). En algunos casos los índices de pérdidas de frutos afectados por podredumbre fúngica puede aumentar hasta un 50%, lo que conlleva grandes pérdidas económicas (Chen, Shen, Chen y Wan, 2019). Estudios previos de Papoutsis, Mathioudakis, Hasperué y Ziogas (2019) establecen que en algunas frutas, como los cítricos, el 80% de las pérdidas son atribuidas a una especie, *Penicillium italicum*. Por otro lado, *P. expansum* y *B. cinerea* también se encuentran entre los fitopatógenos más extendidos, sobre todo en manzanas (Mutlu-Ingok et al., 2020; Fernández-San Millán et al., 2021).

El continuo empleo en el campo de fungicidas químicos para combatir estos agentes fitopatógenos puede inducir la generación de resistencias, además de afectar al medioambiente (Chen et al., 2019). Según Bhavaniramy, Vishnupriya, Al-Aboody, Vijayakumar y Baskaran (2019), el uso de extractos vegetales, provenientes de plantas aromáticas y medicinales, pueden funcionar como alternativa más segura y económica frente a otros fitosanitarios debido a sus propiedades antimicrobianas, fungicidas y antioxidantes. También su empleo como antioxidantes y conservantes en la industria alimentaria permiten garantizar la inocuidad y prolongar la vida útil de los alimentos. Por esta razón, en la industria se está trabajando en el desarrollo de nuevas fuentes de antioxidantes naturales que garanticen la seguridad alimentaria y la salud de los consumidores (Bolouri et al., 2022).

2.1 PLANTAS AROMÁTICAS Y MEDICINALES

Las plantas aromáticas y medicinales (PAM) son un grupo de especies vegetales que se caracterizan por la presencia de compuestos activos relacionados con propiedades bioquímicas y organolépticas, empleadas en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética con fines gastronómicos, aromáticos y terapéuticos (Boncompte Ribera y Minguet Pla, 2006).

Según el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, en 2021 se destinaron en España más de 40.000 hectáreas al cultivo de plantas aromáticas, medicinales y condimentarias, siendo Andalucía y Castilla-La Mancha las comunidades con mayor superficie cultivada (Figura 2.1) (MAPA, 2021a). Los cultivos mayoritarios fueron de anís con 9.123 ha, lavanda y lavandín con 8.099 ha, y pimiento para pimentón con 2.142 ha.

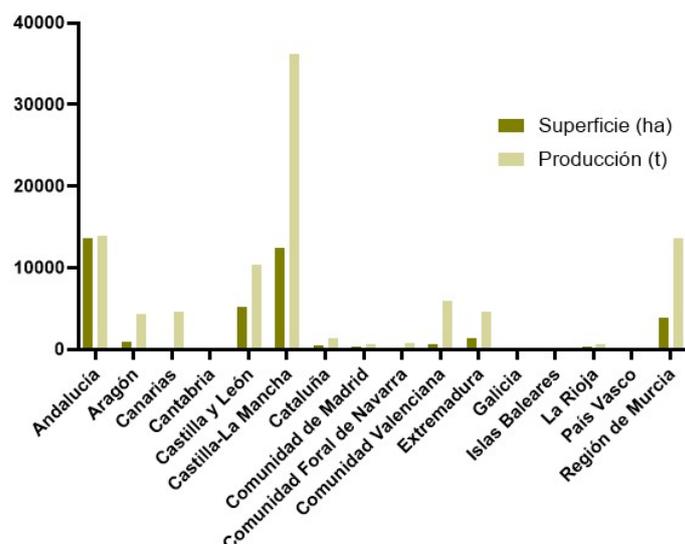


Figura 2.1. Superficie en hectáreas y la producción en toneladas en el año 2021 de cultivos industriales de plantas aromáticas, medicinales y condimentarias (MAPA, 2021a).

En cuanto a la producción se estima que en el mismo año tuvo lugar una cosecha de 97.384 toneladas, siendo los cultivos de anís, lavanda y pimentón aquellos también con mayor producción. Además, Castilla-La Mancha destaca como principal comunidad autónoma productora, con un volumen de 36.187,4 toneladas (MAPA, 2021a).

La producción ecológica ha seguido una evolución creciente en los últimos años aumentando el número total de actividades en un 171% en los últimos 10 años. En el caso del cultivo de plantas aromáticas, medicinales y condimentarias se cultivaron en 2021 en España más de 10 mil hectáreas de forma ecológica, produciéndose de forma estimada un total de 27.561 toneladas (MAPA, 2022).

Los géneros de los vegetales pertenecientes a las plantas aromáticas y medicinales se recogen en un amplio grupo de familias cuya característica común consiste en presentar un gran contenido de sustancias y principios activos con propiedades bioquímicas y organolépticas muy específicas (Boncompte Ribera y Minguet Pla, 2006). La mayoría de las especies que pertenecen a esta categoría forman parte de las siguientes familias: Apiaceae (Umbelliferae), Asteraceae (Compositae), Cupresaceae, Lamiaceae (Labiatae), Lauraceae, Myrtaceae, Poaceae (Gramíneas), Piperaceae, Rutaceae y Zingiberaceae. Las estructuras o aparatos secretores característicos que comparten estas especies botánicas se engloban en 3 categorías: pelos glandulares epidérmicos, cavidades secretoras y canales o conductos secretores esquizógenos (Peñalver, 2005; Fragkouli et al., 2023).

Para una misma especie definida botánicamente pueden existir diferentes quimiotipos, término que hace referencia al perfil químico de una población concreta. Por ejemplo, en el caso de *Salvia rosmarinus* existen tres quimiotipos: el 1,8 cineol, más extendido por Marruecos, el alcanfor, predominante en España y el ABV, acetato de bornilo y verbenona producido en Francia (Peñalver, 2005).

La familia Asteraceae (Compositae) es una de las familias con mayor número de especies descritas, más de 24.000, de las plantas angiospermas. Se emplean en la industria farmacéutica debido a sus propiedades antiinflamatorias, diuréticas, cicatrizantes y antioxidantes. Los aceites esenciales obtenidos de estas especies vegetales presentan propiedades insecticidas y fungicidas (Peñalver, 2005; Fragkouli et al., 2023).

La familia Lamiaceae presenta una amplia variedad de especies de interés debido a sus propiedades biológicas y su relevancia en la industria alimentaria, entre las que se encuentran el orégano (*Organium vulgare*), el tomillo (*Thymus spp.*), el romero (*S. rosmarinus*), la lavanda (*Lavandula spp.*) y la albahaca (*Ocimum basilicum*). Algunas de ellas, de las que entraremos en detalle, como el tomillo y el romero son especies autóctonas de la Península Ibérica junto con algunas otras zonas del sur de Europa y del norte de África (Peñalver, 2005; Fragkouli et al., 2023).

S. rosmarinus se describe como una planta leñosa, vivaz, subarborescente que puede alcanzar hasta los dos metros de altura, con ramas de las que nacen hojas de 15 a 40 mm de longitud, perennes y lanceoladas, con flores de cáliz leñoso y una corola azul, lila, rosa o blanquecina. El fruto de la especie *S. rosmarinus* es un tetráqueno que puede florecer desde el mes de febrero hasta noviembre. El romero se encuentra ampliamente distribuido por la cuenca mediterránea, norte de África y suroeste de Asia. A nivel peninsular puede cultivarse en la mayor parte de las comunidades autónomas que no superen los 1.400 m y cuyo clima sea templado o cálido. Esta elevada distribución viene favorecida por su gran adaptación a diferentes tipos de suelo, aunque los calcáreos faciliten su crecimiento. Los principales compuestos químicos que constituyen los extractos y aceites del romero son alcanfor, que pertenece al grupo de las acetonas, alcoholes como α -terpineol, borneol, linaol, y terpinen-4-ol, 1,8 cineol, pertenece al grupo de los óxidos y puede encontrarse en proporciones cercanos al 50%, y terpenos, al igual que en otras especies, como α y β pineno, canfeno, cariofileno, limoneno, mirceno y p-cimeno (Muñoz, 1993; Peñalver, 2005).

Dentro del género *Thymus* existen múltiples especies, entre las que se encuentra *T. mastichina* o tomillo blanco, endémico de la Península Ibérica. Se caracteriza por ser una planta vivaz, leñosa que puede alcanzar los 40 cm, sus ramas son aterciopeladas, sus hojas son lineares, sentadas y blancas en el envés, sus flores axiales y su fruto un tetraquenio, de color marrón, como otros del mismo género. *T. mastichina* crece en climas templados y cálidos, especialmente en zonas montañosas con altitudes inferiores a los 1.800 m. Así mismo, presenta una gran capacidad de resistir a heladas y sequías. Sin embargo, es muy sensible al déficit o exceso de agua en el suelo y en el ambiente (Muñoz, 1993). En cuanto a su composición, presenta como principal compuesto fenólico el ácido rosmarínico, aunque también se encuentran otros como el ácido metoxisalicílico, la apigenina, el kaempferol, la luteolina, el ácido clorogénico, el ácido cafeico y derivados de luteolina y apigenina. Otros componentes en los extractos de *T. mastichina* son terpenoides como el ácido oleanólico y ursólico (Taghouti et al., 2019b).

Estas especies son usadas en el sector alimentario además de aromatizantes como conservantes debido a sus actividades insecticidas, fungicidas, acaricidas y herbicidas. Estas propiedades también se han encontrado en algunas especies de la familia Apiaceae y Cupressaceae. La familia Cupressaceae se caracteriza por contener un elevado contenido de terpenos, polifenoles y alcaloides, lo que favorece su empleo en la industria farmacéutica (Fragkouli et al., 2023). *J. communis* es una de las especies pertenecientes a esta familia, empleado comúnmente en la industria alimentaria. El enebro se caracteriza por ser un arbusto generalmente inferior a los tres metros, de hojas aciculadas y de frutos en forma de baya de color violeta intenso. Según Basas-Jaumandreu, López y de las Heras (2015) el género *Juniperus* se extiende principalmente por el hemisferio norte desde el sur del Ártico hasta los 30°N de latitud. En la composición química de los extractos obtenidos a partir de esta especie destacan alcoholes como el terpinen-1,4-ol, y terpenos como el α y β -pineno, β -cariofileno, β -cadieno, humuleno, germacreno D, limoneno, mirceno y sabineno. El contenido de α y β -pineno puede variar desde un 10 a un 80% y el sabineno puede alcanzar hasta el 60%, en función de la zona geográfica de estudio (Peñalver, 2005).

Por otro lado, las especies de la familia Brassicaceae también son de importancia para el sector alimentario debido a su cultivo para alimentación humana y animal, así como para la obtención de aceites y biocombustibles. Además, las especies que la forman contienen una elevada diversidad de metabolitos secundarios

formados por compuestos organosulfurados, ácidos fenólicos y flavonoides. Estos metabolitos se relacionan con propiedades beneficiosas para el ser humano, especialmente contra enfermedades degenerativas y para la salud vegetal, debido a sus actividades herbicidas e insecticidas (Fragkouli et al., 2023).

2.2 FACTORES INFLUYENTES EN LAS PROPIEDADES Y LA PRODUCCIÓN DE LAS PLANTAS AROMÁTICAS

Además de estar regulada por el material genético, la síntesis de metabolitos secundarios presentes en los extractos obtenidos a partir de plantas aromáticas, está condicionada por determinados factores, como las condiciones ambientales. Los principales factores abióticos que afectan al rendimiento y los compuestos bioactivos son el clima, la presencia de metales/metaloides, el estrés salino e hídrico, la radiación UV tipo B y el ozono. Por ejemplo, el estrés causado a la planta provoca la liberación a través de las raíces de sustancias como compuestos fenólicos, ácidos orgánicos, azúcares, metabolitos secundarios, aminoácidos y proteínas, con el objetivo de favorecer los mecanismos de quelación de metales en la zona de la rizosfera. Aunque pueda tener lugar el crecimiento vegetal en estas condiciones, la producción de aceites esenciales y su composición puede verse afectada, reduciéndose significativamente sus compuestos mayoritarios (Aqel, Aftab, Khan y Naeem, 2023).

El clima está condicionado por múltiples factores como son la temperatura (según latitud, altitud y lejanía del mar), la humedad, la insolación, o el régimen de viento. Respecto al primer factor abiótico, se debe tener en cuenta la temperatura media, pero también la máxima y mínima en función de la especie. Algunas son sensibles a las heladas (*O. basilicum*) mientras que otras necesitan elevadas horas de frío para su floración (*Hyoscyamus niger*). La temperatura es uno de los factores con mayor influencia en la síntesis de terpenos al estimular la actividad enzimática. La producción de aceites por parte de los vegetales tiene lugar como protección de sus zonas aéreas frente a situaciones de calor y elevada radiación solar, lo que también puede modificar su concentración. En algunos casos puede aumentar proporcionalmente con la exposición al sol como es el caso de la pulegona, el acetato de metilo (*Mentha arvensis* y *M. piperita*) y el geraniol (*T. pulegioides*). En otros casos puede variar debido a un exceso de temperatura, como el mentol (*M. arvensis* y *M. piperita*), la mentona y el mentofurano (*M. arvensis* y *M. piperita*). Otros compuestos aumentan su concentración con el frío, como el geraniol y el cadineno en la albahaca (*O. basilicum*). En cuanto a la humedad y la radiación solar ocurre algo similar, existen

plantas que prefieren un clima más húmedo (*Lythrum salicaria*), la cual vive en zonas cercanas al agua y otras que tienen un comportamiento xerófilo (*Cassia angustifolia*). En el caso de la radiación solar, algunas se ven favorecidas por esta (*L. angustifolia*) mientras que otras buscan la sombra (*Vinca major*). La altitud influencia indirectamente sobre estos factores climáticos, al igual que el régimen de vientos condiciona otros como la lluvia y la temperatura (Muñoz, 1993; Aqeel et al., 2023).

La presencia de metales pesados, así como de sales en el suelo puede afectar al crecimiento vegetal y acumularse dentro de sus estructuras. Las plantas aromáticas presentan diferentes grados de tolerancia a condiciones de alta salinidad y otros compuestos como el carbonato de calcio, por lo que la influencia de estos factores dependerá de la tolerancia del vegetal. Las especies tolerantes a elevadas concentraciones de carbonato de calcio son denominadas calcícolas, mientras que aquellas altamente sensibles se denominan calcífugas. Existen especies que soportan grandes rangos de pH, así como tipos de textura y composición del suelo (Muñoz, 1993; Aqeel et al., 2023).

En particular, la Península Ibérica presenta un ecosistema favorecedor para el desarrollo vegetal de las diferentes familias de plantas aromáticas. Esto se debe a que se caracteriza por una orografía irregular, con suelos polimorfos, un clima continental de influencia atlántica y mediterránea con zonas de microclimas variables. Estos factores favorecen que en zonas especialmente sur y este peninsular, de suelos básicos, calizos y de clima mediterráneo, predominen las plantas aromáticas (Muñoz, 1993).

2.3 EXTRACTOS Y ACEITES ESENCIALES

Según establecen Maurya, Prasad, Das y Dwivedy (2021), los extractos y aceites esenciales se obtienen a partir de la extracción del material procedente de distintos órganos de plantas aromáticas: tallos, cortezas (canela, sándalo, cedro), hojas (Mirtáceas), yemas, flores (Lamiaceae, bergamota, nardo), raíces (angélica y vetiver), semillas (nuez moscada), frutos (anís, comino, alcaravea) y rizomas (cúrcuma y jengibre). Los extractos vegetales se caracterizan por ser sustancias generalmente obtenidas mediante el uso de solventes orgánicos, ya que este proceso permite la concentración de compuestos bioactivos presentes en sus tejidos, eliminando en parte los componentes volátiles presentes en su composición (Fongang Fotsing, Bankeu Kezetas, Gaber El-Saber, Iftikhar y Lenta Ndjakou, 2022). Por otro lado, los aceites esenciales (AE) son compuestos volátiles, productos del metabolismo secundario de

las plantas que presentan propiedades biológicas debido a su bajo peso molecular, inferior a 1000 Da. Los AE se localizan en el citoplasma de las células vegetales, siendo secretados en tricomas o pelos secretores y en zonas de células epidérmicas y secretoras. Los AE contienen una variedad de componentes activos volátiles, entre lo que se encuentran resinas, terpenoides, óxidos, éteres, ésteres, alcaloides, fenoles, taninos, esteroides, glucósidos, aceites volátiles y flavonoides. Los AE se obtienen mediante métodos de extracción específicos, como la destilación por arrastre de vapor o la presión en frío. A diferencia de estos, los extractos se encuentran compuestos por una gama más estrecha de moléculas volátiles (Bhavaniramy et al., 2019; Maurya et al., 2021; Bolouri et al., 2022; Sadgrove, Padilla-González y Phumthum, 2022).

Según Bitwell, Indra, Luke y Kakoma (2023), a lo largo de la vida de los vegetales estos sintetizan moléculas que intervienen en sus procesos de desarrollo, denominados metabolitos y que se clasifican en dos amplias categorías. En la primera categoría se encuentran los metabolitos primarios, que son esenciales para el crecimiento y desarrollo normal de la planta. Estos incluyen ácidos nucleicos, carbohidratos, ácidos grasos, proteínas y moléculas fundamentales para el crecimiento y desarrollo presentes en todos los vegetales, como son los reguladores del crecimiento y aquellos encargados de constituir la pared celular. Por otro lado, existen metabolitos secundarios que desempeñan funciones fisiológicas y bioquímicas con el objetivo de mejorar la capacidad de adaptación y supervivencia al entorno. Se trata por lo tanto de una categoría de compuestos que son sintetizados por los vegetales ante situaciones no asociadas a su propio desarrollo, desde la atracción de depredadores primarios de herbívoros, la protección frente a patógenos, otras plantas y plagas, la atracción de animales diseminadores de semillas y polinizadores, hasta por termotolerancia. La zona en la que se sintetizan estos metabolitos secundarios depende de la función que se deba cumplir. La secreción por parte de las raíces y tallos permite proteger la especie frente a hongos o insectos, mientras que la producción en las semillas busca fines como el control de la germinación. Por esta razón, estos metabolitos secundarios se asocian con propiedades antioxidantes, insecticidas, fungicidas, antibacterianas y antivirales (Peñalver, 2005; Aqel et al., 2023; Bitwell et al., 2023), es decir, son sustancias relacionadas con una actividad biológica y se definen como compuestos bioactivos (Fongang Fotsing et al., 2022).

Algunos de los compuestos considerados metabolitos secundarios se engloban en tres principales grupos. El primero de ellos lo constituyen compuestos formados por

nitrógeno como los alcaloides, glucosinolatos y glucósidos cianogénicos. El segundo grupo está formado por compuestos fenólicos como fenilpropanoides y flavonoides. En tercer lugar se encuentran los terpenos y terpenoides (Rabizadeh, Mirian, Doosti, Kiani-Anbouhi y Eftekhari, 2022).

Los alcaloides constituyen un grupo de sustancias compuestas por átomos de nitrógeno sintetizadas por las plantas en reacción a factores bióticos o abióticos. Por esta razón, destacan por poseer actividades biológicas significativas y presentar una amplia variedad de estructuras. Los glucosinolatos se caracterizan por presentar átomos de azufre y nitrógeno y ser químicamente estables en condiciones normales. Los glucósidos cianogénicos son compuestos formados por azúcares que liberan cianuro de hidrógeno. Otros compuestos presentes en las plantas formados por nitrógeno son los aminoácidos no proteicos y las aminas. Los aminoácidos no proteicos son compuestos fitoquímicos que presentan una similitud estructural con los aminoácidos que forman proteínas y desempeñan un papel de protección de las plantas frente al estrés. Asimismo, actúan como intermediarios en respuesta a influencias ambientales no biológicas. Las aminas son compuestos químicos de bajo peso molecular que contienen nitrógeno y se encuentran habitualmente en las plantas, desempeñando un papel clave en diversos efectos biológicos, incluyendo su función como elementos esenciales en la síntesis de hormonas (Rabizadeh et al., 2022).

Por otro lado, los compuestos fenólicos se caracterizan por estar constituidos por un determinado número de anillos aromáticos y uno o más grupos hidroxilo. Estos pueden encontrarse formando moléculas simples como los ácidos fenólicos hasta más complejas como los taninos. Algunos de ellos se encuentran unidos a otras moléculas como azúcares. Existen diversas categorías para la clasificación de los compuestos fenólicos, pero de forma general, se pueden dividir en dos grandes grupos de moléculas, los compuestos flavonoides y los no flavonoides. Los flavonoides son el grupo más numeroso, perteneciendo a esta categoría componentes como las isoflavonas, los flavonoles, las antocianidinas, los flavanoles y las proantocianidinas. Por otro lado, dentro de los no flavonoides se encuentran ácidos como los hidroxicinámicos y benzoicos y compuestos como los estilbenos. Algunos ejemplos de compuestos fenólicos son el ácido carnósico, ácido rosmarínico, el carnosol, rosmanol, rosmadial y carnosato de metilo presente en los extractos de romero. Los compuestos fenólicos se caracterizan por constituir esencias y pigmentos, generar sabores y

texturas, además de presentar propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y beneficiosas frente a enfermedades que afectan al ser humano (Vicente Illera, 2012).

Los terpenos son estructuralmente y funcionalmente diferentes al resto de elementos químicos que forman los extractos y aceites esenciales. Están formados por unidades de terpenos de cinco carbonos conocidos como isoprenos. Los terpenos pueden ser acíclicos en el caso de que la cadena se encuentre abierta y cíclicos si esta se encuentra cerrada. Dentro de los cíclicos en función del número de anillos cerrados que lo componen pueden clasificarse en monocíclicos y bicíclicos. Los monoterpenos constituyen el 90% de los terpenos, y consisten en un terpeno acíclico formado a partir de la unión de dos isoprenos, algunos ejemplos son el ocimeno y mirceno (Peñalver, 2005).

Además de estos grupos de compuestos, en el material vegetal se encuentran presentes otros componentes como ácidos orgánicos, hidrocarburos y ácidos grasos (Rabizadeh et al., 2022).

2.4 MÉTODOS CONVENCIONALES Y NUEVAS TECNOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN

Según Arsad, Danlami, Zaini y Sulaiman (2014) la extracción es una de las etapas más importantes para la separación, identificación y obtención de compuestos químicos de interés de la matriz vegetal. La extracción conlleva unos pasos fundamentales en los que se incluyen el prelavado, el secado o la liofilización del material vegetal y la molienda para obtener una muestra uniforme con el objetivo de mejorar la velocidad de extracción y aumentar la interacción de la muestra con los solventes mediante una mayor superficie de contacto. La extracción favorece la separación y caracterización de los compuestos bioactivos. Para la obtención del extracto se pueden realizar etapas posteriores de secado en el caso de desear un extracto seco o de evaporación (Bitwell et al., 2023).

Las técnicas empleadas habitualmente para la extracción de compuestos fenólicos y volátiles de plantas aromáticas son la hidrodestilación y la destilación por arrastre de vapor, la maceración con alcoholes, la extracción Soxhlet y la extracción y destilación conjunta. Actualmente, se están desarrollando nuevas técnicas que buscan maximizar la recuperación de los compuestos activos presentes de forma natural en el vegetal, como es la extracción mediante fluidos supercríticos (SFE), extracción

acelerada con disolvente (ASE), extracción asistida por ultrasonidos (UAE), extracción asistida por microondas (MAE) y extracción con fluidos presurizados (PLE) (Arsad et al., 2014; Rodríguez-Solana, Salgado, Domínguez y Cortés-Diéguez, 2014).

2.4.1. Extracción Soxhlet

La extracción tradicional mediante Soxhlet permite la obtención de compuestos de una muestra sólida mediante la acción de un solvente orgánico en el que estos componentes son solubles. Para llevar a cabo el método se introduce la muestra seca en un cartucho de celulosa poroso y se dispone en el extractor. El solvente se calienta y el condensado cae sobre el cartucho de celulosa con la muestra, enriqueciéndose en los solutos del material vegetal. El nivel de condensado aumenta hasta que alcanza un rebose y el sifón lo descarga sobre el matraz de destilación (Figura 2.2). Los solutos son depositados sobre el matraz de destilación donde la fracción de solvente se destilará de nuevo reanudando el ciclo de extracción y favoreciendo la concentración de solutos en el matraz hasta que estos se hayan extraído por completo (Arsad et al., 2014; Redfern, Kinninmonth, Burdass y Verran, 2014; López-Bascón y Luque de Castro, 2020).

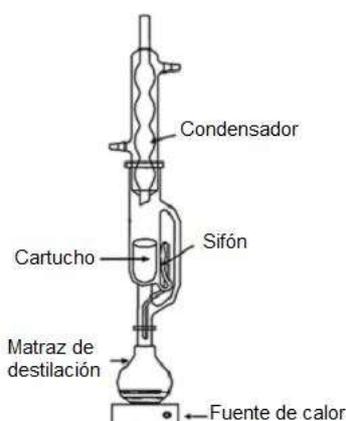


Figura 2.2. Extractor Soxhlet (López-Bascón y Luque de Castro, 2020).

Las ventajas de este método de extracción se basan en una elevada transferencia de masa debido a las numerosas tomas de contacto entre la muestra y el solvente, una temperatura de trabajo elevada y en no requerir una etapa de filtrado del extracto al final del proceso. Por último, al tratarse de un equipo económico se puede aumentar el rendimiento de la muestra mediante una extracción paralela con otros extractores. Sin embargo, también presenta múltiples desventajas como el prolongado tiempo que es necesario para llevar a cabo la extracción, la pérdida de compuestos termolábiles debido a las temperaturas alcanzadas, la incapacidad de realizar la extracción mediante agitación, la necesidad de una etapa de evaporación al final del

proceso y que la técnica no es automatizable y viene determinada por la selectividad del solvente (López-Bascón y Luque de Castro, 2020).

Hasta hace unos años, habitualmente se empleaba hexano como solvente para la extracción Soxhlet, pero debido a su toxicidad para el ambiente y con el fin de garantizar la seguridad en el laboratorio actualmente se emplean principalmente etanol, agua, hidrocarburos e isopropanol. El método Soxhlet actualmente se emplea para la obtención de compuestos antioxidantes y fenólicos y con el fin de realizar análisis de diferentes materias vegetales (Arsad et al., 2014).

2.4.2. Extracción Soxhlet asistida por microondas y ultrasonidos

Además del convencional, existen otros diseños del método Soxhlet como el asistido por ultrasonidos o por microondas que permiten alcanzar una mayor efectividad y una reducción del tiempo de extracción, y por tanto, del número de ciclos y del consumo de solvente. En ambos casos se parte de un diseño similar a un Soxhlet convencional donde la zona en la que tiene lugar la extracción de la muestra se encuentra rodeada por un horno microondas o por un baño o generador de ultrasonidos (Figura 2.3) (López-Bascón y Luque de Castro, 2020).

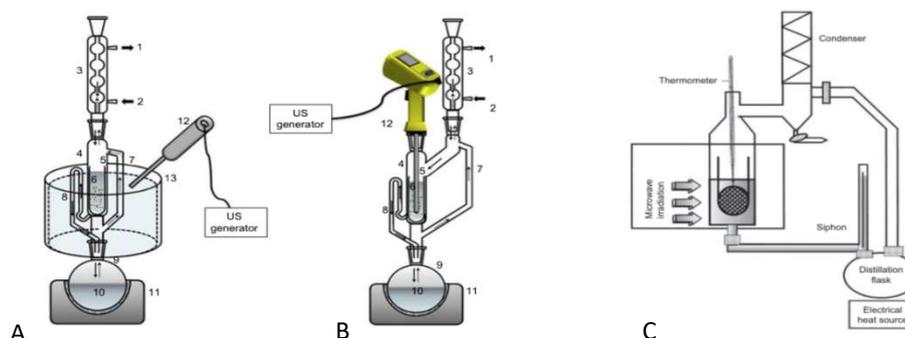


Figura 2.3. Extracción Soxhlet asistida por ultrasonidos (A y B) y por microondas (C). (A) Extracción Soxhlet asistida por ultrasonidos donde el generador se encuentra en un baño que rodea la zona de extracción (4). (B) Extracción Soxhlet asistida por ultrasonidos generados directamente en la zona de extracción (4) (López-Bascón y Luque de Castro, 2020).

En el caso de las microondas, permite la adición de solventes durante el proceso de extracción y la extracción de mayores volúmenes de material vegetal. Sin embargo, requiere una etapa posterior de filtrado que separe los compuestos sólidos y no es de utilidad para obtener compuestos termosensibles. Por otro lado, la principal desventaja de la extracción asistida por ultrasonidos es su efecto oxidativo con la materia grasa extraída. También presenta otras limitaciones asociadas a las ondas, reduciendo la zona de extracción a la más cercana al foco donde se generan. Las

aplicaciones más comunes para este método se basan en la extracción de compuestos volátiles responsables del sabor y aroma en productos alimentarios y de cosmética, así como de compuestos con propiedades antioxidantes, antimicrobianas y terapéuticas (Arsad et al, 2014; López-Bascón y Luque de Castro, 2020).

2.4.3. Extracción mediante fluidos supercríticos (SFE)

La extracción SFE se caracteriza por el uso de un fluido a temperatura y presión por encima de las críticas, lo que proporciona características intermedias entre fase líquida y gaseosa. Con el objetivo de alcanzar el punto crítico del solvente elegido, se debe controlar la temperatura y presión del sistema, teniendo en cuenta las condiciones críticas de cada solvente (Tabla 2.1) (Arsad et al., 2014).

Tabla 2.1. Solventes supercríticos y su temperatura y presión críticas (Arsad et al., 2014).

Solvente	Temperatura (K)	Presión (MPa)
Agua	647	220
Metano	190,4	4,6
Etano	305,3	4,87
Propano	369,8	4,25
Metanol	512,6	8,09
Etanol	513,9	6,14
CO₂	304,1	7,38

Este método tiene lugar por la interacción del fluido supercrítico con la muestra vegetal, solubilizando sus componentes en el fluido. El solvente circula en un circuito cerrado en la zona de extracción para que se mantenga a la temperatura y presión establecidas. Una vez se completa la extracción, el fluido disuelto atraviesa un separador en el que la apertura de una válvula permite la salida y el barrido de los solutos a una zona restrictiva, por donde al circular el fluido supercrítico se descomprimirá hasta presión atmosférica disminuyendo su poder disolvente y favoreciendo el precipitado de los solutos (Arsad et al, 2014).

Las principales ventajas de este método son la reducción de los tiempos de extracción, su fácil automatización, que no requiere etapa de filtrado, y que suaviza las condiciones de trabajo, lo que permite la obtención de compuestos sensibles al calor. Por otro lado, también existen desventajas como su instalación y la necesidad de optimizar los parámetros de trabajo, así como de ser un equipo económicamente costoso. Además, existe el riesgo de perder solutos de interés si se emplean fluidos

con densidades superiores a estos con presiones altas como el CO₂ e incluso la obstrucción del equipo si estos son de gran tamaño (Arsad et al, 2014).

Generalmente el método se aplica a aproximaciones analíticas y como paso previo a la cuantificación y obtención de aromas y colorantes (Arsad et al, 2014).

2.4.4. Extracción con fluidos presurizados (PLE)

La extracción acelerada por fluidos presurizados emplea solventes con unos rangos de temperatura de 323 a 473 K y de presión de 3,5 a 20 MPa. El empleo de altas presiones permite trabajar con temperaturas superiores a las de ebullición del solvente lo que aumenta la transferencia de masa y reduce los tiempos de extracción. El equipo de PLE se encuentra rodeando la zona de extracción y el solvente se introduce a la cámara mediante una bomba cuya presión es controlada mediante una válvula de alivio (Figura 2.4). La eliminación de los solventes residuales al final del proceso se lleva a cabo mediante una purga con nitrógeno (Arsad et al, 2014).

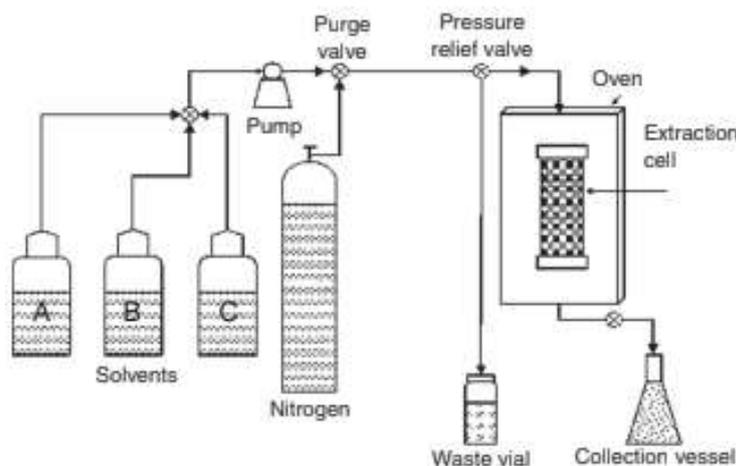


Figura 2.4. Esquema de un sistema de PLE (Arsad et al, 2014).

Entre las ventajas de este método se incluyen una mejor cinética de extracción al emplear temperaturas superiores, gran reproducibilidad, facilidad de cambio de condiciones y parámetros, menor oxidación de la materia orgánica debido al uso de nitrógeno, fácil empleo y automatización del sistema. Sin embargo, también se favorece la degradación de compuestos termolábiles, su selectividad depende directamente del tipo de solvente y no es aplicable a escalas industriales. Sus principales aplicaciones son la extracción de contaminantes orgánicos y esteroides (Arsad et al, 2014; López-Bascón y Luque de Castro, 2020).

2.4.5 Pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV)

La extracción de compuestos de plantas aromáticas mediante pulsos eléctricos de alto voltaje es un método de extracción no térmica que emplea la energía de los pulsos eléctricos para liberar los compuestos bioactivos de las plantas. Existen diversos estudios sobre su uso en la extracción de compuestos fenólicos de cítricos, vainilla y cacao, así como en romero y tomillo (Tzima, Brunton, Lyng, Frontuto y Rai, 2021; Carpentieri, Režek Jambrak, Ferrari y Pataro, 2022).

En este proceso, se aplica una elevada diferencia de potencial (0,5-10 kV/cm) durante periodos cortos de tiempo (1 μ s-1 ms) (Figura 2.5) que genera un campo eléctrico cuya intensidad depende directamente del valor del voltaje aplicado y de la distancia entre los electrodos. Si se supera un umbral determinado, se produce la ruptura de la compartimentalización celular liberándose los compuestos presentes en las células. Este umbral varía según el tipo de célula y las condiciones experimentales (Carpentieri et al., 2022).

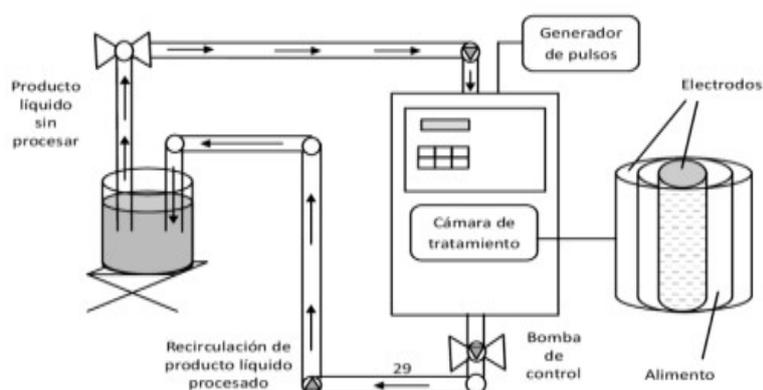


Figura 2.5. Esquema del proceso de extracción mediante pulsos eléctricos (Jaime Gato, 2021).

Este método presenta varias ventajas como el tratamiento selectivo de los compuestos intracelulares mediante el ajuste del campo eléctrico, sin dañar otras estructuras celulares, lo que permite alcanzar rendimientos mayores que mediante otros métodos. Además, precisa de una necesidad de energía relativamente baja (1-20 kJ/kg) y cortos tiempos de tratamiento lo que se traduce en un consumo energético moderado. Sin embargo, la aplicación de pulsos eléctricos de alta intensidad y energía puede generar la degradación de componentes bioactivos termosensibles, afectando a la cantidad de los compuestos extraídos (Tzima et al., 2021; Carpentieri et al., 2022).

2.5. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN

La optimización de los parámetros de extracción es una etapa importante para asegurar la máxima calidad y cantidad de los compuestos que se desean extraer. Además del método empleado para llevar a cabo el proceso de extracción, existen otros factores que influyen como el tamaño de partícula, la temperatura, el tiempo de extracción, o la proporción solvente y muestra. La materia vegetal de la que se parte también puede afectar a la extracción. Baydar, Özkan, Erbaş y Altindal (2009) observaron que el momento de recolección del romero afectaba significativamente en el rendimiento, contenido en fenoles totales y la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos. Por otro lado, un tamaño de partícula reducido facilita que los solventes penetren mejor en la matriz vegetal y que los solutos se difundan con mayor eficacia. No obstante, si las partículas son demasiado pequeñas, pueden absorber excesivamente los solutos del sólido, lo que dificultaría su posterior filtración.

Además, conviene seleccionar correctamente el solvente y la técnica de extracción que más se adecúa al propósito planteado. Solventes como el etanol y metanol son ampliamente empleados debido a que favorecen la extracción de compuestos fenólicos respecto a otros solventes como el agua. Aunque su difícil gestión lo hace menos práctico para extrapolar su uso en la industria, Roby, Sarhan, Selim y Khalel (2012) obtuvieron mejores resultados empleando metanol, seguido por el etanol, en comparación otros solventes menos polares como el hexano y dietiléter. Además de conocer el solvente que se desea emplear, se debe determinar la concentración más adecuada para llevar a cabo la extracción. Elboughdiri, Ghernaout, Kriaa y Jamoussi (2020) y Fejér, Kron, Grul'ová y Eliašová (2020) determinaron que para maximizar el contenido de fenoles totales en extractos de *J. communis*, las concentraciones óptimas de etanol como solvente eran de 60% y 70% respectivamente. La proporción de solvente que se emplea respecto al contenido de materia vegetal se encuentra también directamente relacionada con el rendimiento de la extracción. Ratios muy elevados pueden provocar que los solventes se saturen de compuestos lo que dificulta la difusión de estos y prolonga los tiempos necesarios para concentrar el extracto (Zhang, Lin y Ye, 2018; Lopes et al., 2020).

Por último, otros parámetros como la temperatura, tiempo y presión, en el caso de ser aplicable y modificable, afectan significativamente sobre la extracción de compuestos. Cuanto mayor sea la temperatura mayor es la solubilización y difusión del material vegetal. Por otro lado, si son muy elevadas se pueden perder compuestos

volátiles y parte del solvente empleado, así como generar compuestos indeseables. El tiempo de extracción afecta positivamente sobre la eficiencia de la extracción (Zhang et al., 2018).

Para desarrollar, mejorar y optimizar esta clase de experimentos existen técnicas matemáticas y estadísticas, como la metodología superficie de respuesta (RSM) de Box y Wilson (1951). Generalmente, la aplicación de esta metodología se basa en analizar situaciones en las que una o varias respuestas de interés se encuentran influenciadas por varios factores y optimizar esta o estas respuestas mediante la determinación de los valores óptimos de los factores estudiados (Mahallati, 2020). La relación entre los factores y la respuesta vendrá dada por la siguiente ecuación:

$$Y=f(X_1, X_2, \dots, X_n)+ E \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde, “Y” representa la respuesta de interés y se encuentra definida en función de las variables independientes “X_i”. Por otro lado, el error observado o ruido se define como E. Las variables “X₁, X₂, ..., X_n” son adimensionales, con media cero y la misma desviación estándar.

En la RSM, las gráficas obtenidas son superficies de respuesta en las que se evalúan los efectos entre las variables del estudio sobre la respuesta. La función respuesta es desconocida, por lo que se debe aproximar mediante un ajuste polinómico de primer o segundo grado (Kumari y Gupta, 2019; Shijie, 2020), como muestran las ecuaciones 2 y 3, respectivamente.

$$Y=\beta_0+\beta_1X_1+\beta_2X_2+\dots+\beta_nX_n+E \quad (\text{Ec. 2})$$

$$Y=\beta_0+\sum_{i=1}^n\beta_iX_i+\sum_{i=1}^n\beta_{ii}X_i^2+\sum_{i<j}\beta_{ij}X_iX_j+E \quad (\text{Ec. 3})$$

Siendo para ambas ecuaciones “Y”, la respuesta esperada, “X_i” y “X_j” las variables independientes, “β₀”, una constante, “β_i”, el coeficiente lineal, “β_{ii}”, el coeficiente cuadrático, y “β_{ij}”, el coeficiente de interacción entre las diferentes variables, obtenido mediante un análisis de varianza (ANOVA).

Los modelos de primer orden consisten en modelos factoriales y fracciones de la serie 2^k, así como diseños simplex. Siendo k el número de factores implicados. En este tipo de modelos se obtienen un menor número de combinaciones de factores, en comparación con los de segundo grado.

Los dos principales diseños factoriales para desarrollar modelos polinómicos de segundo orden son el diseño compuesto central (CCD) y el diseño de Box Behnken, este último fue desarrollado por Box y Behnken (1960).

Los modelos polinómicos de segundo grado emplean diseños factoriales 3^k lo que supone un elevado número de combinaciones y los diseños CCD y Box-Behnken permiten ajustar este modelo con combinaciones menores. Sin embargo, el diseño Box Behnken precisa de menores puntos experimentales que el diseño CCD lo que se traduce en un menor coste de estudio para el mismo número de factores (Shijie, 2020).

El diseño descrito por Box y Behnken (1960) presenta mínimo tres factores con tres niveles por factor (-1, 0, +1), siendo cero el punto central de las variables a estudiar, esquemáticamente se obtiene un diseño (Figura 2.6).

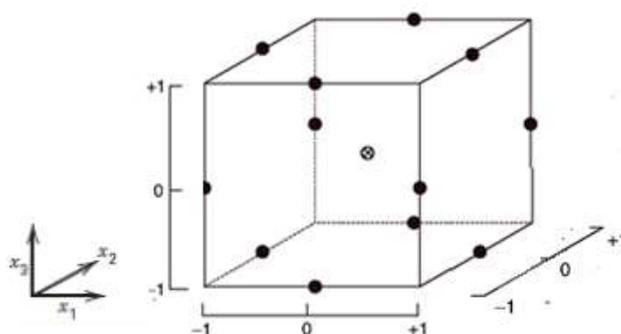


Figura 2.6. Diseño Box-Behnken con 3 factores (Mojaddam y Pullen, 2019).

2.6. PROPIEDADES DE LAS PLANTAS AROMÁTICAS

Las plantas aromáticas se han empleado con fines medicinales desde hace miles de años (Giannenas et al., 2021). Las propiedades de los aceites esenciales y extractos están influenciadas por diversos factores, tales como el origen geográfico de la planta, las partes específicas utilizadas, la sexualidad de la planta, el momento de la recolección y el método de extracción empleado (Mutlu-Ingok et al., 2020; Semerdjieva et al., 2021). Estos elementos tienen un impacto directo sobre el perfil químico del extracto o aceite resultante. Conforme han señalado Bakkali, Averbeck, Averbeck e Idaomar (2008) y Jaime Gato (2021) a las plantas aromáticas se les atribuyen una diversidad de efectos beneficiosos, que incluyen propiedades antimicrobianas, insecticidas, parasiticidas, antioxidantes, antiinflamatorias, antimutagénicas, antihipertensivas y antitrombóticas.

2.6.1. Propiedades antimicrobianas

El efecto antimicrobiano de los extractos y aceites esenciales se puede clasificar en dos categorías: efecto bacteriostático, asociado a la inhibición del crecimiento microbiano, y efecto bactericida, responsable de la muerte bacteriana (Mutlu-Ingok et al., 2020).

La actividad antimicrobiana de las plantas aromáticas no se asocia únicamente con compuestos volátiles como monoterpenos y sesquiterpenos. Los extractos que incluyen otros metabolitos secundarios no volátiles como alcaloides, taninos, fenoles y flavonoides habitualmente producen efectos sinérgicos responsables de inhibir el crecimiento microbiano (Sadgrove et al., 2022). Por ejemplo, en extractos de romero existen diferentes moléculas de naturaleza no volátil con estas propiedades, entre las que se encuentran el ácido carnósico y rosmarínico, rosmanol, carnosol, rosmaridifenol, isorosmanol y epirosmanol (Jaime Gato, 2021; Zhang, Gu, Xu y Fu, 2021). Existen diferentes mecanismos por los que los metabolitos secundarios actúan sobre los microorganismos. Algunos como el carvacrol, timol y eugenol pueden actuar sobre la membrana celular alterando el transporte de electrones y provocando la coagulación del citoplasma. El timol y carvacrol, así como los compuestos fenólicos, también pueden actuar directamente sobre la pared celular causando daño estructural. Además, los compuestos fenólicos son responsables de inactivar la síntesis de aminoácidos esenciales (Bhavaniramya et al., 2019; Jaime Gato, 2021).

Las bacterias Gram-positivas como *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* y Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter* spp. y *Salmonella typhimurium* se comportan de diferente manera al enfrentarlas a los extractos de las plantas aromáticas. Los efectos antimicrobianos de los extractos vegetales afectan de manera más pronunciada a las bacterias Gram-positivas debido a la estructura de su membrana externa, que en el caso de las bacterias Gram-negativas está compuesta por una bicapa lipídica conectada a la membrana interna mediante lipopolisacáridos (Mutlu-Ingok et al., 2020; Bolouri et al., 2022). Según Thielmann, Murany y Kazman (2019) algunas plantas aromáticas empleadas para inhibir el crecimiento bacteriano de patógenos como *S. aureus* y *E. coli* pertenecen a las especies *Thymus* spp., *Origanum* spp. y *Cinnamomum* spp., cuyo efecto viene asociado a la presencia de monoterpenos, principalmente timol, carvacrol y cinamaldehído.

El tomillo también se relaciona con la inhibición de hongos patógenos como *Aspergillus carbonarius*, *A. niger*, *A. flavus*, *Penicillium* spp., *F. solani* y *B. cinerea*. Así como contra toxinas como la Aflatoxina B₂, Aflatoxina B₁, Aflatoxina G₁. Otras especies vegetales como la *S. rosmarinus* también inhibe otros hongos como *F. verticillioides*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *Mucor pusillus*, *A. oryzae* y *A. alternata* (Mutlu-Ingok et al., 2020).

2.6.2. Propiedades insecticidas

Los extractos de plantas aromáticas han sido reconocidos por su capacidad insecticida, lo que implica tanto la repulsión como el control de las poblaciones (Dhifi, Bellili, Jazi, Bahloul y Mnif, 2016), ya que se ha establecido que uno de los mecanismos empleados para llevar a cabo su efecto insecticida consiste en interferir sobre el sistema nervioso de los insectos y sus neurotransmisores, produciendo posteriormente su parálisis o muerte. Algunas de las plantas aromáticas relacionadas con esta propiedad son *Eucalyptus* spp., *Mentha* spp., *Lavandula* spp. y *Pinus* spp. (Kostyukovsky, Rafaeli, Gileadi, Demchenko y Shaaya, 2002).

Algunos de los insectos sobre los que se observa este efecto son los escarabajos *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae) y *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae), *Stephanitis pyri* (Hymenoptera: Stephanidae), *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae), *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). Algunos compuestos bioactivos de plantas aromáticas se emplean en la formulación de preparados comerciales como la citronela (*Cymbopogon nardus*) con el objetivo de hacer frente a mosquitos (Dhifi et al., 2016).

2.6.3. Propiedades antioxidantes

La respiración celular es la responsable de la generación de radicales libres asociados al consumo de oxígeno. Una de las principales causas de lesiones celulares y orgánicas en un organismo se debe al estrés oxidativo provocado por la interacción de estos radicales libres con diferentes moléculas. El estrés oxidativo es el responsable de provocar alteraciones en el material genético de los organismos, promoviendo el envejecimiento celular y cáncer, así como generar otras afecciones como inflamación, asma y diabetes, y agravar otras como el Alzheimer y enfermedades cardiovasculares. Los antioxidantes actúan eliminando los radicales libres y evitando que estas afecciones tengan lugar. También resulta de interés en la industria alimentaria con el objetivo de evitar la oxidación lipídica, responsable de la

pérdida de calidad sensorial en productos grasos como derivados lácteos, frutos secos, productos cárnicos y de la pesca (Jaime Gato, 2021; Zekeya et al., 2022).

Algunos de los compuestos bioactivos más relacionados con la capacidad antioxidante de las plantas aromáticas y medicinales son los compuestos fenólicos y los terpenos, específicamente los monoterpenos como el timol y carvacrol presentes en extractos de *Origanum tyttanthum*, *M. longifolia* y *T. serpyllus*, entre otros (Dhifi et al., 2016).

2.7 USOS Y APLICACIONES DE LOS EXTRACTOS EN LA INDUSTRIA

De forma tradicional, las plantas aromáticas y medicinales han sido empleadas como condimentos y especias en las comidas con fines aromáticos y saborizantes. En la industria también se han empleado con fines aromatizantes en bebidas, alimentos y suplementos dietéticos (Bolouri et al., 2022).

El crecimiento microbiano y la producción de toxinas asociado a este, provocan pérdidas de calidad organoléptica e inocuidad en las matrices alimentarias. Por esta razón, existen múltiples métodos de conservación para evitar y retrasar estos fenómenos indeseables. Algunas de las sustancias habitualmente empleadas para evitar la proliferación de microorganismos son el benzoato de sodio, los nitritos y nitratos y el sorbato de potasio. El uso persistente de antimicrobianos químicos puede inducir la generación de cepas bacterianas resistentes, por lo que los extractos de plantas aromáticas y medicinales presentan potencial para su uso como conservante en la industria alimentaria. Algunos ejemplos son el uso de extractos de orégano (*O. vulgare*), milenrama (*Achillea millefolium*) y el serpol (*T. serpyllum*) como inhibidores de crecimiento de *E. coli* en quesos. Otros compuestos fitoquímicos empleados con este fin son el α -bisabolol presente en la camomila (*Matricaria chamomilla*), los β -carotenos y flavonoles de especies como la caléndula (*Calendula officinallis*), el linalool y acetato de linalilo de la lavanda (*L. angustifolia*) y por último, las antraquinonas presentes en *Aloe vera*. La alta diversidad de compuestos activos en los extractos vegetales favorece su empleo como agentes antimicrobianos y antioxidantes. Algunos antioxidantes naturales conocidos son las saponinas, ácido ferúlico y β -sitosterol, presentes en la cebolla (*Allium cepa*), o el dialil disulfuro y trisulfuro del ajo (*A. sativum*). Sin embargo, la obtención de los extractos presenta escasa reproducibilidad debido a que se ve afectado por las fluctuaciones cualitativas y cuantitativas de los compuestos bioactivos que contienen, y su uso en determinados productos alimenticios puede presentar una serie de desventajas, como una influencia

negativa sobre las propiedades organolépticas características de los mismos. Por ello, es necesario encontrar una combinación adecuada como sucede con la adición de extracto de pimienta negra en carne fresca en una concentración de entre 0,1 y 0,5% para reducir la oxidación tanto de lipoproteínas como del color durante su conservación, así como para inhibir el crecimiento de levaduras y coliformes en salmón marinado (Librán et al., 2013; Bolouri et al., 2022).

Otra posible aplicación de los extractos en la industria alimentaria puede ser mejorar las características del envasado de los productos. Uno de los métodos consiste en sustituir los antioxidantes comerciales añadidos a los envases activos por compuestos bioactivos naturales. Algunos de los antioxidantes naturales que pueden ser empleados con esta finalidad son los tocoferoles, los aceites esenciales y los extractos. El extracto de té verde se ha empleado en envases de carne combinado con una película de almidón consiguiendo reducir la oxidación lipídica. También se han hecho estudios empleando el extracto de té en envases de jamón cocido con otros objetivos como mantener el color del producto y las características sensoriales durante su periodo de almacenamiento (Bolouri et al., 2022). Según Zhu, Li, Cui y Lin (2021) el uso de aceites esenciales en envases alimentarios tiene la limitación de su naturaleza principalmente volátil, la cual es vulnerable a múltiples factores ambientales como el aire, temperatura, iluminación, humedad y condiciones de conservación del alimento. Por este motivo durante el almacenamiento puede reducirse drásticamente la concentración de determinados componentes, como es el caso del citral, componente mayoritario del aceite de limón, que en un periodo de tiempo de 12 días se vio reducido cerca del 92%.

Para prolongar la presencia de compuestos bioactivos volátiles en los materiales de los envases existen técnicas como la nanoencapsulación, obteniéndose únicamente un 33% de pérdidas de citral bajo las mismas condiciones que el estudio previo. Esta técnica consiste en la encapsulación de los compuestos de interés mediante diferentes técnicas como liposomas, ciclodextrina, dióxido de silicio, nanoemulsiones, nanopartículas sólidas líquidas, nanofibras y films comestibles, con el objetivo de aumentar su solubilidad y minimizar su volatilización, oxidación y descomposición. Un ejemplo de estas técnicas en alimentos es el uso de *Litsea cubeba* encapsulada para inhibir el crecimiento de *E. coli* O157:H7 en zumos de pepino, zanahoria y espinacas (Bhavaniramy et al., 2019).

Otra de las aplicaciones de los extractos y aceites esenciales de plantas aromáticas tiene lugar en la agricultura, tanto en los cultivos como en la postcosecha debido a sus múltiples propiedades insecticidas, herbicidas y antimicrobianas, algunos ejemplos de productos químicos comerciales empleados en el campo se recogen en la tabla 2.2 (Bhavaniramy et al., 2019).

Tabla 2.2. Productos químicos comerciales para la protección de cultivos con extractos de plantas aromáticas en su formulación (Bhavaniramy et al., 2019).

Fuente del extracto	Nombre comercial	Aplicaciones	Referencias
<i>Azadirachta indica</i>	Trilogy™	Insecticida, fungicida y acaricida	(Agrisolver, 2019)
<i>Melaleuca alternifolia</i>	Timorex™	Fungicida, especializado en marchitamiento por <i>Fusarium</i> spp.	(Stk bio-aq technologies, 2018)
<i>Mentha piperita</i>	Fungastop™	Fungicida para el control de pudrición gris en vid por <i>Botrytis cinerea</i>	(Adama, 2021)
<i>Reynoutria sachalinensis</i>	Milsana™	Fungicida y bactericida.	(Santra y Banerjee, 2020)
<i>Salvia rosmarinus</i>	Sporan™	Fungicida	(Deresa y Diriba, 2023)
<i>Salvia rosmarinus</i> , <i>Thymus vulgaris</i> , <i>Syzygium aromaticum</i>	Sporatec™	Fungicida	(Khadduri, 2011)
<i>Sesamum indicum</i>	Organocide™	Insecticida, fungicida y acaricida	(Oliveira, Ramos Campos y Fernandes Fraceto, 2018)
<i>Thymus vulgaris</i>	Promax™	Fungicida y nematocida	(Santra y Banerjee, 2020)

El uso de insecticidas sintéticos ha sido ampliamente extendido desde hace años con el objetivo de evitar posibles enfermedades postcosecha. En el año 2021 en España se comercializaron 9.961 toneladas de insecticidas, un 2% superior al dato del año 2020, y 18.388 toneladas de herbicidas (MAPA, 2021b). En la actualidad existen preparados comerciales basados en extractos de clavo (*Syzygium aromaticum*), romero (*S. rosmarinus*), menta (género *Mentha*), limón (*Citrus limon*), tomillo (*T.*

vulgaris) y canela (*Cinnamomum verum*), entre otros, con fines de control de plagas (Bolouri et al., 2022). Estudios como el de Sofi et al. (2022) evaluaron el efecto larvicida de extractos de *Artemisia absinthium* frente a larvas de *Aedes aegypti* consiguiendo el 92% de efecto larvicida tras la exposición durante 24 horas al extracto en una concentración de 1000 ppm.

La aplicación de aceites esenciales sobre plantas, especialmente de especies como el maíz (*Zea mays*), cebada (*Hordeum vulgare*) y trigo (*Triticum aestivum*), puede prevenir la germinación previa a la cosecha de sus semillas. La germinación precoz puede deberse a múltiples factores bióticos y abióticos, va a depender de la genética de la variedad cultivada, del estado de la semilla, así como de las precipitaciones y temperatura durante su cultivo. Se llevaron a cabo estudios de diferentes aceites esenciales: comino (*Cuminum cyminum*), lavanda (*L. angustifolia*), tomillo, inhibiendo por completo la germinación de la cebada y trigo a diferentes concentraciones, siendo el comino el aceite con mayor efecto inhibitor. Estos aceites esenciales también mostraron efectos beneficiosos para el control de malezas y plántulas indeseables en los cultivos. El potencial herbicida de los aceites y extractos vegetales es debido a la presencia de compuestos como los taninos, alcaloides y glucósidos, y establece una alternativa a los herbicidas químicos para el control de la flora arvense (Bolouri et al., 2022).

Por otro lado, la presencia de algunos microorganismos en los cultivos reduce la vida útil de los productos agrícolas, así como pérdidas económicas para los productores. En España en 2021 se comercializaron 41.613 toneladas de fungicidas y bactericidas autorizados, un 4,5% más que el año anterior (MAPA, 2021b). La actividad antimicrobiana de los extractos de las plantas aromáticas potencia el uso de estas frente a productos convencionales. Algunos fitopatógenos como *A. alternata* pueden ser inhibidos por extractos de espliego (*L. latifolia*) debido especialmente a la presencia de compuestos como el linalol. Otros como *A. flavus* y *B. cinerea* se muestran susceptibles a la presencia de compuestos como el anetol y la carvona presentes en el anís (*Pimpinella anisum*) y la abésoda (*Nigella sativa*), respectivamente (Bolouri et al., 2022). Los extractos también pueden ser empleados como tratamiento postcosecha frente a hongos de almacenamiento en productos como los cítricos, los cuales se pueden ver afectados por *Penicillium italicum* y *P. digitatum*. Los compuestos fenólicos presentes en los extractos en una concentración de 20 µg/mL son efectivos para inhibir por completo el crecimiento de ambas especies del

género *Penicillium* (Tripathi y Dubey, 2003). Nikkhah, Hashemi, Habibi Najafi y Farhoosh (2017) observaron que existía un efecto sinérgico entre aceites esenciales de especies, como el tomillo y la canela, contra *P. expansum* y *B. cinerea*.

La industria cosmética ha empleado plantas aromáticas y medicinales para la obtención de perfumes y cosméticos desde la antigüedad. En Egipto ya se obtenían aceites esenciales empleando métodos de extracción con vapor, mientras que en Roma y Grecia realizaban procesos de destilación. Gran parte de los aceites esenciales empleados a lo largo de la historia se formaban a base de alcanfor, compuesto aromático presente en múltiples especies como *S. rosmarinus*, *A. annua*, *Cedrus libani*, *Piper angustifolium*, *Sassafras albidum*, *Acacia vestita* y *Ocimum kilimandscharicum* (Bolouri et al., 2022).

En la actualidad, uno de los intereses de los consumidores se basa en búsqueda de cosméticos y productos de higiene de origen natural y respetuosos con el medio ambiente. El empleo de compuestos bioactivos de plantas aromáticas y medicinales en la formulación de este tipo de productos se asocia a sus propiedades antimicrobianas, antioxidantes y antiinflamatorias tanto por su capacidad conservante como por ser un ingrediente activo (Bolouri et al., 2022).

Los aceites esenciales de especies vegetales como el romero y la manzanilla pueden actuar como agente nutritivo, hidratante y fortalecedor de los folículos pilosos del cuero cabelludo. Otros como la menta, están relacionados con un efecto estimulante para el crecimiento del pelo. Es por esta razón que su uso es habitual en productos como el champú, mascarillas y acondicionadores. También son ampliamente empleados en otros productos como cremas faciales y protectores solares, debido a su capacidad de absorción de la radiación ultravioleta de entre 290 y 400 nm (ondas untravioleta de tipo B y A), su actividad antibacteriana que evita la proliferación del acné asociado a especies como el *Cutibacterium acnes* (Bolouri et al., 2022).

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La realización de este trabajo de fin de estudios (TFE) se engloba dentro de una de las líneas de trabajo principales del proyecto de investigación Gestión Forestal y agricultura sostenibles para la obtención de bioproductos de alto valor frente al reto demográfico (BIOVALOR). El proyecto se encuentra coordinado por el Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT), los

procesos de extracción de compuestos de interés los lidera el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA) y está financiado por la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO).

Concretamente, el TFE se centra en el estudio del potencial de extractos, procedentes de plantas aromático-medicinales (PAM) autóctonas y adaptadas a tierras marginales, para su inclusión como materias primas activas en distintas etapas de la producción e industria agroalimentarias. Para lograr este objetivo principal, se fijaron una serie de objetivos parciales que se enumeran a continuación:

1. Caracterizar los extractos obtenidos de tres especies de PAM seleccionadas en estudios anteriores para optimizar, mediante la metodología de superficie de respuesta (RSM), su extracción Soxhlet en base a los parámetros más relevantes del proceso.
2. Validar los modelos obtenidos para cada especie estudiada.
3. Evaluar la bioactividad *in vitro* de los extractos obtenidos frente a microorganismos de interés en el sector agroalimentario.

En cuanto a la contribución del TFE a los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), este proyecto contribuye al Objetivo 2 relativo a lograr la seguridad alimentaria, la mejora de la nutrición y la promoción de la agricultura sostenible. La razón por la que se fomenta este objetivo se debe a que el uso de las plantas aromáticas y medicinales presenta varias aplicaciones, entre las que se encuentran propiedades acaricidas, insecticidas y fungicidas, que permite reducir el consumo de fertilizantes convencionales. Además, sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas resultan interesantes para su uso como conservantes en los alimentos, evitando el uso de conservantes potencialmente desfavorables, aumentando su vida útil y evitando pérdidas de calidad higiénica y organoléptica.

Por otro lado, también se contribuye a cumplir el Objetivo 12, que consiste en la producción y consumo responsables, en el que se busca disminuir el desperdicio alimentario. El uso de las plantas aromáticas y sus extractos en tratamientos pre y postcosecha, así como en la industria como conservantes, favorece la disminución de pérdidas de alimentos debidas a alteraciones y enfermedades asociadas a microorganismos patógenos.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. MATERIAL VEGETAL

El material vegetal empleado en este proyecto proviene de las partes aéreas de 3 especies de plantas aromáticas (tomillo blanco, romero y enebro) recolectadas cuando el 75% de la planta había alcanzado su etapa de floración. Las distintas especies vegetales empleadas en este estudio y su procedencia se encuentran recogidas en la tabla 4.1. Estas especies pasaron por una etapa previa de secado al aire antes de someter las distintas partes vegetales, en las que se incluyen flores, hojas, tallos y frutos, a una etapa de molienda hasta conseguir un tamaño de partícula homogéneo. Mediante un cribado de las partículas previamente molidas se consiguió aislar aquellas con un tamaño entre 0,5 y 0,6 mm.

Tabla 4.1. Materia vegetal empleada en este proyecto.

Muestra vegetal de partida	Muestra tamizada	Nombre científico	Nombre común	Origen
		<i>Thymus mastichina</i>	Tomillo blanco o mejorana	Lubia, Soria. (Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas, CIEMAT)
		<i>Salvia rosmarinus</i>	Romero	Mas de las Matas, Teruel.
		<i>Juniperus communis</i>	Enebro	Fuentelcampo, Soria.

4.2. REACTIVOS EMPLEADOS

Los reactivos utilizados para llevar a cabo los diferentes ensayos de laboratorio son los siguientes: Carbonato de sodio (NaCO_3) (Supelco, Alemania), metanol y reactivo Folin-Ciocalteu (VWR Chemicals; Rosny-sous-bois, Francia), etanol (SAEQSA; Zaragoza, España), radical libre 2,2-difenil-1-picrilhirazil (DPPH) y ácido gálico (Thermo Fisher scientific; Kandel, Alemania), ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano (Trolox) y Tween 80 (Panreac; Barcelona, España).

4.3. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS A PARTIR DE LAS ESPECIES VEGETALES SELECCIONADAS

4.3.1. Método de extracción

La extracción de las diferentes especies de plantas aromáticas se llevó a cabo con el objetivo de obtener un extracto con propiedades funcionales. El extractor Soxhlet (Behr; Düsseldorf; Alemania) empleado presenta la capacidad de procesar seis muestras simultáneamente (Figura 4.1).



Figura 4.1. Equipo de extracción Soxhlet de seis puestos.

En función de las ratios de solvente por peso de planta seca empleados se pesaron las diferentes cantidades de las muestras vegetales. El material vegetal se dispuso en cartuchos de celulosa (CHMLAB; Barcelona, España) de tamaño 30 mm x 80 mm que se introdujeron en el cuerpo del extractor Soxhlet. Simultáneamente se adicionaron 150 mL de solvente a la concentración establecida en los matraces de evaporación del equipo.

Los solventes empleados fueron etanol y agua destilada en diferentes proporciones. El comienzo de la extracción se estableció como el momento en el que el solvente condensa en la columna de refrigeración y precipita sobre la muestra. Los tiempos en los que tuvo lugar la extracción fueron de 1 a 3 h. Los extractos obtenidos se almacenaron en refrigeración en frascos ámbar para evitar la oxidación de compuestos por acción directa de la luz.

4.3.2 Evaporación

Una vez obtenido el extracto líquido, tuvo lugar una etapa de evaporación mediante un evaporador rotativo modelo Hei-VAP Expert (Heidolph; Schwabach, Alemania) (Figura 4.2) con el objetivo de eliminar el etanol presente en los extractos y permitir su posterior liofilización.



Figura 4.2. Evaporador rotativo empleado para la evaporación de los extractos vegetales.

Los parámetros establecidos para la evaporación del etanol corresponden con los óptimos según el manual del equipo empleado (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Parámetros empleados para la evaporación de etanol.

Presión absoluta (mbar)	Velocidad (rpm)	Temperatura baño (°C)	Tiempo (min)
75	260	50	18

El tiempo de evaporación se establece como aquel en el cual se obtiene la completa evaporación de las muestras con etanol puro. Con el objetivo de facilitar la recuperación del extracto evaporado en muestras con solvente al 99% de etanol se añadió de forma previa a la evaporación un volumen constante de 50 mL de agua

destilada. Finalmente, los extractos no etanólicos obtenidos se almacenaron de nuevo en refrigeración en frascos de vidrio ámbar.

4.3.3 Liofilización

La última etapa para la obtención del extracto seco fue su liofilización mediante un liofilizador modelo Lyobeta 4PS (Telstar, Terassa, España) (Figura 4.3).



Figura 4.3. Liofilizador (Telstar; Terassa, España) empleado para la concentración de los extractos.

Los extractos evaporados se dispusieron en bandejas metálicas, previamente pesadas, formando una fina capa. Todas las bandejas con extractos se pesaron antes y después de su liofilización y se sometieron a las condiciones recogidas en la tabla 4.3.

Tabla 4.3. Parámetros empleados para la liofilización de los extractos.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (horas)	Presión (μbar)
Secado primario	-40	16	100
Secado primario	-20	24	100
Secado primario	0	18	100
Secado secundario	25	24	0

Las bandejas se envolvieron en una película plástica con el fin de evitar la posible contaminación entre muestras durante el proceso (Figura 4.4).

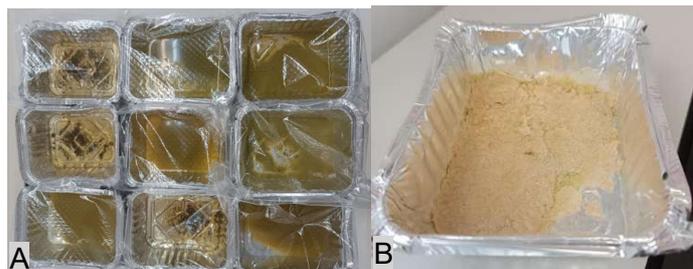


Figura 4.4. Aspecto de las bandejas previas (A) y tras la etapa de liofilización.

Una vez liofilizados los extractos se dispusieron en bolsas identificadas (Figura 4.5) y se conservaron en un desecador para evitar su rehidratación.



Figura 4.5. Aspecto final de los extractos liofilizados.

El peso de extracto liofilizado recuperado se calculó mediante la ecuación 4, para posteriormente emplearlo en el cálculo del rendimiento.

$$E_{\text{liofilizado}} = W_{b+\text{Elif}} - W_b \quad (\text{Ec. 4})$$

Siendo " $E_{\text{liofilizado}}$ " el extracto liofilizado en unidades de masa y " $W_{b+\text{Elif}}$ " y " W_b ", los pesos de la bandeja junto con el extracto liofilizado y de la bandeja vacía, respectivamente.

4.4. DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS DE INTERÉS

4.4.1. Determinación del rendimiento

El rendimiento de las extracciones de cada especie se determinó a partir del extracto liofilizado resultante tras las etapas anteriormente. El extracto se pesó en una balanza de precisión, y junto con los pesos de materia vegetal de partida se procedió al cálculo del rendimiento porcentual aplicando la ecuación 5.

$$Rto (\%) = \frac{W_i - W_f}{W_i} \times 100 \quad (\text{Ec. 5})$$

donde "Rto" hace referencia al rendimiento en porcentaje, " W_i " es el peso inicial de materia vegetal y " W_f " se corresponde con el peso final después de obtener el extracto.

4.4.2. Preparación de la muestra para la cuantificación de los compuestos de interés

En tubos Falcon se añadieron 10 mL de etanol al 60% y se suspendieron 0,01 g del extracto liofilizado previamente obtenido de cada especie. Las muestras se homogenizaron mediante un Vortex (OHAUS; Naenikon, Switzerland) para garantizar su total solubilización y se filtraron por un filtro de 0,45 μm (LABBOX; Premià de Dalt, Barcelona) (Figura 4.6).

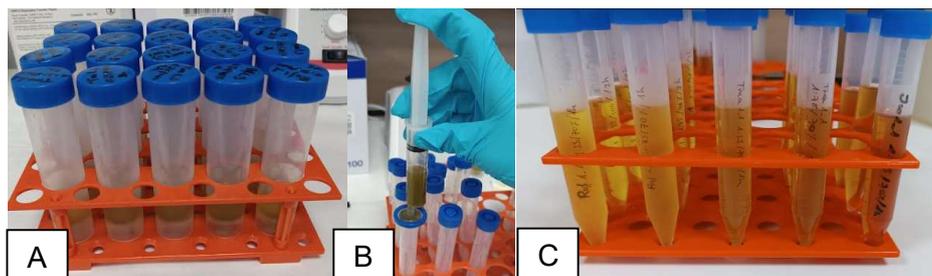


Figura 4.6. Dilución del extracto liofilizado (A), filtrado (B) y extracto filtrado (C).

Posteriormente, se realizaron diferentes pruebas para determinar la dilución más conveniente para los ensayos de capacidad antioxidante y fenoles totales, evaluando diluciones de la suspensión desde la 1:2 a la 1:100, siendo la 1:50 la más adecuada al encontrarse dentro de los rangos de la curva patrón de ambos ensayos.

4.4.3. Determinación de la capacidad antioxidante

El procedimiento para determinar la capacidad antioxidante se llevó a cabo mediante la prueba colorimétrica basada en el método propuesto por Llorach, Tomás-Barberán y Ferreres (2004). En este proceso, se mezclaron 10 μL de los extractos fenólicos, previamente diluidos, con 290 μL de una solución de radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), la cual fue preparada previamente disolviendo 9,65 mg de DPPH en un volumen total de 250 mL de metanol al 80%. Tras incubar las muestras en oscuridad durante diez minutos se midió su absorbancia a una longitud de onda de 515 nm.

La curva patrón (0-200 mg/L) se preparó a partir de una solución stock de Trolox (1 mg/mL) en metanol al 80%, la cual se diluyó a una concentración de 200 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para realizar las diluciones seriadas necesarias. En cada una de estas diluciones, se añadieron 290 μL de DPPH y se procedió a realizar la curva de calibración tras el periodo de incubación (Figura 4.7).

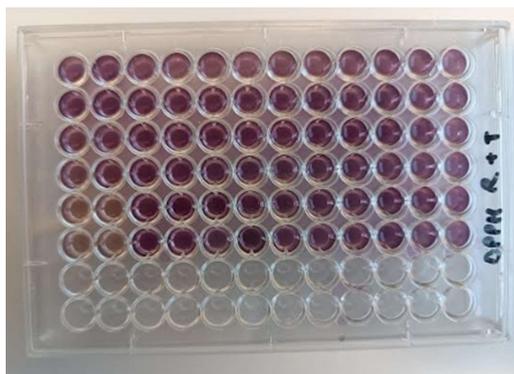


Figura 4.7. Placas de 96 pocillos con las curvas de calibración y las muestras para la determinación de la capacidad antioxidante mediante el método del DPPH.

4.4.4. Determinación del contenido de fenoles totales

La determinación de la concentración de compuestos fenólicos totales se realizó modificando el método descrito por Singleton y Rossi (1965). Para ello, se tomaron placas de 96 pocillos y en cada uno de ellos se añadieron 10 μL de extracto junto con 80 μL de agua destilada. A continuación, se incorporaron 80 μL del reactivo Folin-Ciocalteu 0,25 N, seguidos de 30 μL de carbonato de sodio 1N. Después de 60 minutos de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad, se midió la absorbancia de la muestra a 760 nm utilizando un espectrofotómetro (Izasa; Madrid, España).

Los resultados se expresaron en mg de ácido gálico por g de peso seco, al considerarse uno de los compuestos fenólicos mayoritarios en los vegetales. Para obtener la curva patrón, se prepararon soluciones estándar de ácido gálico en concentraciones de 0 hasta 250 mg/L y se sometieron al mismo proceso que las muestras para determinar su absorbancia (Figura 4.8).

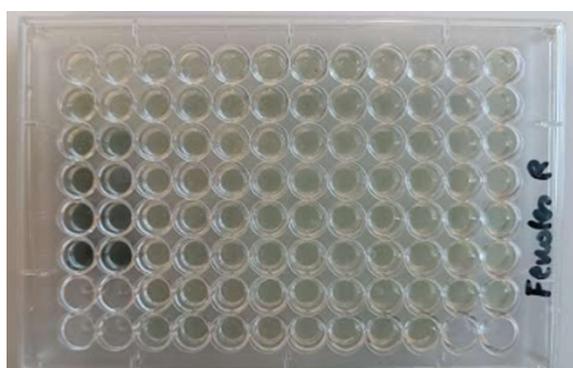


Figura 4.8. Placas de 96 pocillos con las curvas de calibración y las muestras para la determinación de fenoles totales.

4.5. OPTIMIZACIÓN DE DIFERENTES PARÁMETROS DE LA EXTRACCIÓN

4.5.1. Diseño experimental para la optimización de la extracción mediante la metodología de superficie respuesta

Uno de los objetivos parciales de este estudio consiste en maximizar el rendimiento, el contenido en fenoles totales y la capacidad antioxidante de 3 extractos de plantas aromáticas (*S. rosmarinus*, *T. mastichina* y *J. communis*) mediante la optimización de la extracción tipo Soxhlet. Para ello se empleó etanol como solvente, al ser un solvente de baja toxicidad frente a otros como el metanol y ser ampliamente empleado en la extracción de compuestos activos de tejidos vegetales y especialmente en plantas aromáticas (Zhang et al., 2018; Silva, Cadavez, Ferreira-Santos, Teixeira y Gonzales-Barron, 2021).

La optimización de las condiciones de extracción se llevó a cabo mediante la metodología de superficie respuesta (RSM) analizando los resultados obtenidos tras el desarrollo de un diseño experimental Box Behnken. Las variables independientes seleccionadas para el estudio y sus rangos de trabajo fueron la concentración de etanol (40 a 99%), ratio en peso-volumen de material vegetal de partida y disolvente (1:75 a 1:25 g/mL) y tiempo de la etapa de extracción (1 a 3 h) (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Variables y niveles del Diseño Box-Behnken.

Factor	Nivel		
	-1	0	+1
X₁: Ratio muestra y solvente (m/v)	1:75	1:50	1:25
X₂: Concentración solvente (%)	40	70	99
X₃: Tiempo extracción (horas)	1	2	3

Con estas variables y mediante la interfaz gráfica de usuario R-Studio del lenguaje de programación R (General Public License Project) se desarrolló el diseño experimental (Figura 4.9), que resultó en un total de 15 combinaciones experimentales (Tabla 4.5), que se realizaron por triplicado, y que está definido por los siguientes elementos:

1. Diseño factorial 3^k completo o diseño cúbico (k=3).
2. 3 réplicas del punto central (n₀=3).

3. Dos puntos axiales en los ejes que corresponden a cada uno de los factores centrados en las caras ($\alpha=1$).

```
#Diseño BBD
set.seed(123)
diseno_bbd<-bbd(k=3,n0=3,
                coding=list(x1~(EtOH-70)/30,x2~(Ratio-50)/25,x3~(tiempo-2)/1),
                randomize=TRUE, block=FALSE)
diseno_bbd

Data are stored in coded form using these coding formulas ...
x1 ~ (EtOH - 70)/30
x2 ~ (Ratio - 50)/25
x3 ~ (tiempo - 2)/1
```

Figura 4.9. Código empleado para el diseño de Box-Behnken y la obtención de las combinaciones de las variables experimentales.

Tabla 4.5. Diseño experimental de Box-Behnken para la optimización de la extracción con las variables independientes codificadas.

Ensayos	Variables independientes		
	Concentración disolvente (% EtOH)	Ratio (m/v)	Tiempo (horas)
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	+1	+1
5	-1	0	-1
6	+1	+1	0
7	+1	0	+1
8	-1	0	+1
9	+1	0	-1
10	0	-1	-1
11	+1	-1	0
12	0	-1	+1
13	0	+1	-1
14	-1	-1	0
15	-1	+1	0

La esquematización de los puntos a realizar experimentalmente también se realizó mediante la herramienta R-Studio (Figura 4.10).

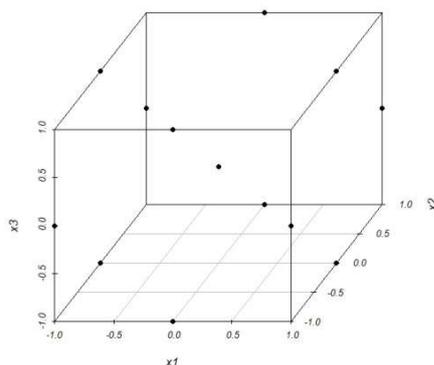


Figura 4.10. Representación gráfica del diseño experimental de Box-Behnken y sus variables independientes codificadas, correspondiendo x_1 , x_2 y x_3 a la concentración de disolvente, la ratio y el tiempo, respectivamente.

4.5.2. Influencia de las variables independientes en el proceso de extracción, análisis estadístico y validación de la optimización

Finalmente, los modelos que definen la influencia de las variables independientes en el proceso de extracción se obtuvieron y analizaron mediante el complemento Essential Experiment Design de Microsoft Excel. Los datos experimentales se ajustaron a diferentes regresiones múltiples: lineal, cuadrática y cúbica para obtener las ecuaciones de los diferentes modelos que explican la extracción en función de las variables independientes seleccionadas. Mediante un análisis de varianza (ANOVA) de estas regresiones se excluyeron de los modelos aquellos términos que no resultaron estadísticamente significativos con un nivel de confianza inferior al 95% (p -valor $> 0,05$) siguiendo el procedimiento de eliminación hacia atrás. A continuación, se evaluó la bondad del ajuste comparando los coeficientes R^2 y R^2 ajustado, así como la significancia de la falta de ajuste de los modelos. Finalmente, se valoraron posibles desviaciones en los modelos mediante la correlación de los valores de las variables dependientes obtenidos experimentalmente y sus respectivos residuos estandarizados con los teóricos mediante una regresión por mínimos cuadrados.

Una vez seleccionado el modelo que mejor ajustó los datos, se determinaron las condiciones óptimas de extracción para cada especie mediante el algoritmo GRG (Generalized Reduced Gradient) Nonlinear establecido por Lasdon, Fox y Ratner (1974) empleando la herramienta Solver de Microsoft Excel, con el objetivo de maximizar las tres respuestas: rendimiento, concentración de fenoles totales y capacidad antioxidante por el método DPPH. Esta metodología consiste en optimizar una función objetivo de forma que sus variables independientes dependan de un

número de restricciones. De este modo se crea un sistema de ecuaciones a partir del cual se obtienen los valores de las variables que maximizan o minimizan dicha función. Las condiciones óptimas para cada especie vegetal se obtuvieron en dos etapas. En la primera, se realizó una maximización de cada respuesta de forma independiente a partir de su correspondiente ecuación como función objetivo. Una vez conocido el valor máximo que podía alcanzar cada respuesta, se usó para determinar las condiciones con las que se obtuvieran los valores de las tres respuestas en conjunto que más se aproximaran al máximo calculado individualmente. Para llevarlo a cabo se tomó una de las ecuaciones como función objetivo y se introdujeron las ecuaciones restantes como restricciones. En ambos cálculos se tuvieron en cuenta como restricciones los rangos experimentales de cada variable estudiada. Finalmente, las condiciones de extracción resultantes se reprodujeron en el laboratorio por triplicado para obtener el extracto óptimo de cada especie, y comprobar que las características se ajustasen a las estimadas por los modelos. La determinación de los intervalos de confianza se realizó con un nivel de significancia (α) de 0,05.

4.6. EVALUACIÓN IN VITRO DE LA CAPACIDAD ANTIFÚNGICA

4.6.1. Preparación de las soluciones de esporas fúngicas

Se evaluó la actividad antifúngica de los extractos frente a diferentes hongos fitopatógenos de relevancia agroalimentaria: *Cladosporium* sp., *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, *Penicillium italicum*, *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum*, *Rhizopus stolonifer* y *Monilinia fructicola*. Para ello, se partió de cultivos puros aislados por el grupo de investigación e identificados por técnicas de biología molecular. Estas cepas están conservadas en un crioprotector, por lo que fue necesario una revivificación previa en caldo de dextrosa de patata (PDB) (Figura 4.11) que se incubó a 25 °C durante 5 d.

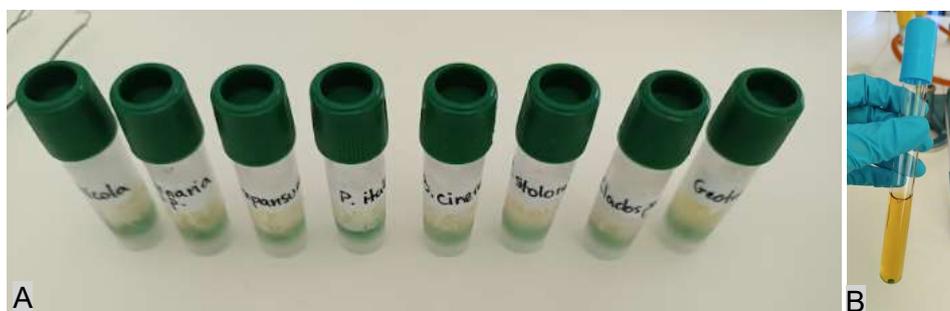


Figura 4.11. Crioviales con los diferentes inóculos empleados (A) y caldo PDB con inóculo (B).

Una vez transcurrido este periodo de tiempo, los tubos de ensayo inoculados presentaron crecimiento fúngico (Figura 4.12) y se sembraron por duplicado en placas de agar de dextrosa de patata (PDA), que se incubaron a 25 °C durante 5 d. De esta forma se dispuso de una superficie mayor para el crecimiento y esporulación de los mohos (Figura 4.13), permitiendo obtener una cantidad de esporas adecuada para realizar el ensayo de capacidad antifúngica de los extractos. La solución de esporas de cada especie se obtuvo vertiendo 10 mL de agua de peptona esterilizada en cada placa, arrastrando con un asa de siembra la mayor cantidad posible de esporas y posteriormente filtrando esa suspensión a través de una gasa estéril para su recuperación en un tubo de ensayo (Figura 4.14).

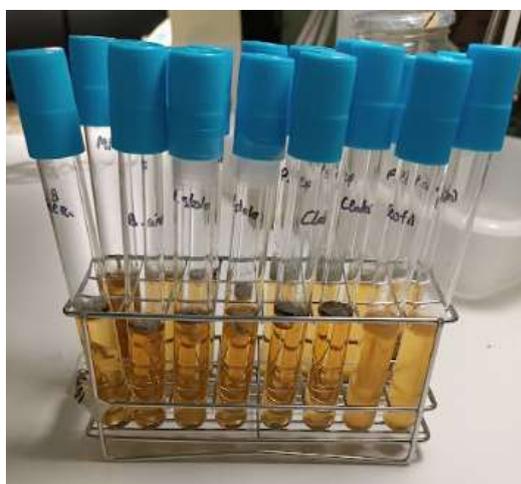


Figura 4.12. Tubos de ensayo de caldo PDB con inóculo tras 5 días a 25 °C.

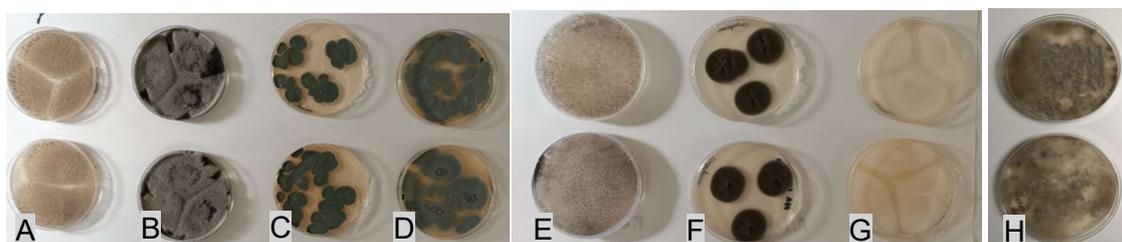


Figura 4.13. Placas sembradas con los diferentes hongos estudiados: *M. fructicola* (A), *A. alternata* (B), *P. expansum* (C), *P. italicum* (D), *R. stolonifer* (E), *Cladosporium* sp. (F), *G. candidum* (G) y *B. cinerea* (H).

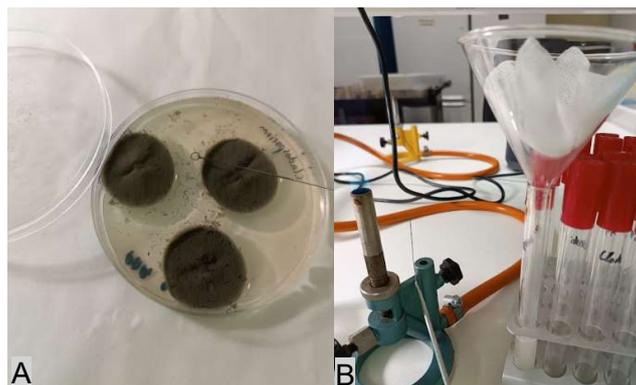


Figura 4.14. Recogida en placa de hongos esporulados (A) y recuperación de las esporas en un tubo de ensayo (B).

Finalmente, se determinó la concentración de las suspensiones de esporas mediante una cámara de Neubauer en microscopio óptico. Una vez conocida la concentración se realizaron las diferentes diluciones hasta conseguir una concentración final entre $0,8$ y 2×10^6 esporas/mL (Figura 4.15).

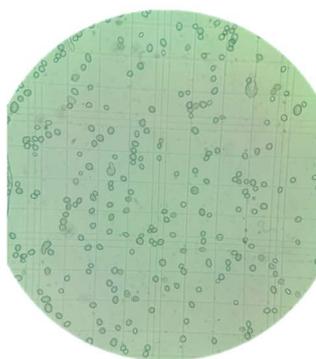


Figura 4.15. Esporas fúngicas observadas por microscopio óptico en una cámara de Neubauer.

4.6.2. Determinación de la actividad antifúngica

El efecto fungicida de los extractos se evaluó mediante el cultivo de los hongos en placas de 48 pocillos (Avantor; Pensilvania, Estados Unidos) según la metodología de microdilución (Figura 4.16) establecida por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) (2008) con modificaciones. La concentración de partida de los extractos de *S. rosmarinus*, *T. mastichina* y *J. communis* empleada en el ensayo fue 100 mg/mL, a partir de la cual se realizaron diluciones seriadas para obtener concentraciones de 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,563, 0,781, 0,391 y 0,195 mg/mL. En cada placa se estudió por triplicado una especie vegetal frente a uno de los hongos estudiados, y se introdujeron controles tanto positivos, para evaluar el correcto crecimiento de la cepa, como negativos, para garantizar que los extractos no estén

contaminados (Figura 4.17). El medio de cultivo que se empleó fue PDB con Tween 80 al 0,05% y etanol al 3% con el objetivo de favorecer la dilución del extracto. El crecimiento de los microorganismos se evaluó visualmente mediante la apreciación de turbidez, y el desarrollo de micelio y esporas en los pocillos.

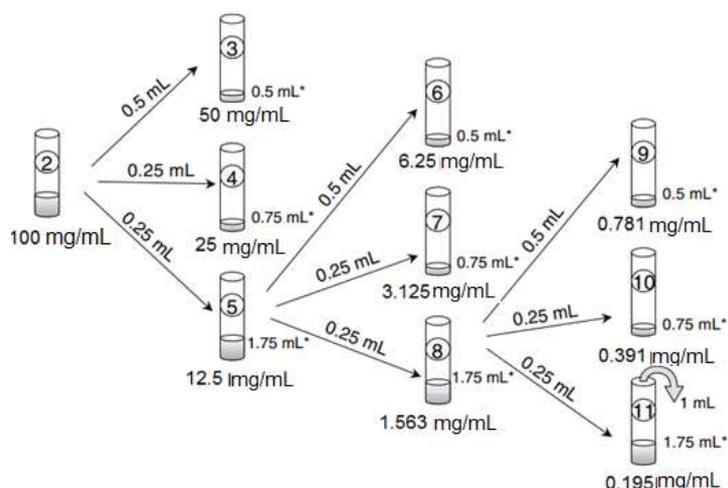


Figura 4.16. Diluciones y microdiluciones realizadas para un ensayo de agentes antifúngicos con modificaciones (Espinel-Ingroff y Cantón, 2007).

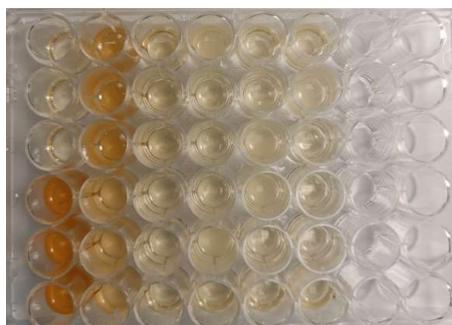


Figura 4.17. Placa con las microdiluciones a estudiar y sus controles de crecimiento y esterilidad del extracto de la especie *J.communis*.

Por último, se calculó la concentración mínima inhibidora (CMI) y fungicida (CMF) de aquellos extractos que mostraron inhibir el crecimiento fúngico. La CMI se establece como aquella concentración ensayada más baja que reduce el crecimiento fúngico en más de un 95%, y por tanto, no se observa crecimiento a simple vista. Mientras que la CMF hace referencia a la mínima concentración en la que se produce una inhibición del crecimiento en un 99-99,5%. Para determinar la CMF se realizaron hasta cuatro diluciones de las concentraciones de extractos que mostraban inhibición total en las placas multipocillos y se inocularon 100 μ L de cada una en placas de agar Diclórán Rosa de Bengala y Cloranfenicol (DRBC) junto con un control de crecimiento.

Estas placas se incubaron 5 d a 25 °C, si pasado ese tiempo el crecimiento es inferior a 3 colonias, se establece como CFM (Espinel-Ingroff y Cantón, 2007).

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN

En la optimización las diferentes variables independientes estudiadas correspondientes a la ratio de muestra y solvente empleado, la concentración de solvente, en este caso etanol, y el tiempo de extracción, se denominaron como X_1 , X_2 y X_3 , respectivamente. Para cada respuesta se ajustaron los datos a modelos lineales, cúbicos y cuadráticos, siendo estos últimos los que presentaron un ajuste estadísticamente significativo ($p < 0,05$) y una mayor R^2 y R^2 ajustado en todos los casos. Las ecuaciones resultantes tienen como finalidad reproducir el comportamiento de las variables independientes con respecto a las diferentes respuestas analizadas en este estudio para caracterizar los extractos de las especies *S. rosmarinus*, *T. mastichina* y *J. communis* (rendimiento (Y_1), contenido de fenoles totales (Y_2) y capacidad antioxidante (Y_3)).

5.1.1. Influencia de las condiciones de extracción estudiadas y optimización de las mismas para obtener extractos bioactivos de la especie *Salvia rosmarinus*

Como se observa en la tabla 5.1, los valores obtenidos de rendimiento, fenoles totales y capacidad antioxidante en los extractos de romero variaron entre de 22,89-41,07%, 62,80-117,13 mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/g extracto liofilizado y 0,89-1,64 mmol Trolox/g extracto liofilizado, respectivamente. Si se compara con lo establecido por la literatura, el rango de rendimientos observados en la obtención de extractos etanólicos de romero se encuentra entre el 8,74-39,60%, por lo que los valores conseguidos se encuentran dentro e incluso superando ligeramente este rango (Baydar et al., 2009; Outaleb et al., 2015; Hosseini, Bolourian, Hamgini y Mahababadi, 2018). El contenido en compuestos fenólicos, tuvo un comportamiento similar al del rendimiento, encontrándose cerca del valor máximo expuesto por diversos estudios, los cuales varían entre 3,4 y 119 mg GAE/g extracto seco (Baydar et al., 2009; Jordán, Lax, Rota, Lorán y Sotomayor, 2013; Outaleb et al., 2015; Hosseini et al., 2018; Yedes et al., 2022; Dhouibi et al., 2023). Por último, la capacidad antioxidante también se encuentra dentro de lo establecido por diversos estudios, en los que obtuvieron

valores desde 0,178 hasta 7,786 mmol Trolox/g de extracto seco (Hosseini et al., 2018; Vieira, Shimano, Lima y de Camargo, 2019).

Tabla 5.1. Diseño experimental y respuesta de las variables dependientes en la extracción de *S. rosmarinus*. Intervalo de confianza de $\alpha=0,05$, $n=3$ (Y_1) y $n=6$ (Y_2 e Y_3).

Ensayo	Variables independientes			Variables dependientes		
	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	Y ₂	Y ₃
1	50	40	1	33,44 ± 1,77	97,65 ± 0,98	1,26 ± 0,06
2	50	100	1	22,89 ± 0,23	85,23 ± 4,72	1,14 ± 0,55
3	75	70	1	36,61 ± 2,00	92,95 ± 1,50	1,11 ± 0,03
4	25	70	1	33,31 ± 0,32	101,98 ± 2,46	1,20 ± 0,02
5	25	100	2	28,57 ± 0,21	84,37 ± 3,29	1,10 ± 0,11
6	50	70	2	37,37 ± 0,36	96,22 ± 6,59	1,23 ± 0,01
7	50	70	2	38,52 ± 0,97	94,81 ± 8,34	1,18 ± 0,02
8	50	70	2	37,59 ± 0,85	101,51 ± 4,07	1,21 ± 0,03
9	75	100	2	30,64 ± 0,80	79,31 ± 1,46	0,98 ± 0,16
10	75	40	2	30,11 ± 1,39	92,90 ± 4,54	1,11 ± 0,11
11	25	40	2	30,21 ± 1,15	62,80 ± 0,79	1,64 ± 0,12
12	25	70	3	34,28 ± 1,50	79,79 ± 0,25	0,90 ± 0,05
13	50	100	3	26,47 ± 4,91	84,13 ± 5,61	1,29 ± 0,10
14	50	40	3	41,07 ± 1,33	117,13 ± 6,87	1,61 ± 0,10
15	75	70	3	34,16 ± 0,68	91,57 ± 1,54	1,27 ± 0,05

X₁: Ratio (mL solvente/g de muestra); X₂: Concentración etanol (%); X₃: Tiempo (h); Y₁: Rendimiento (%); Y₂: Contenido en fenoles totales (mg GAE/g extracto liofilizado); Y₃: Capacidad antioxidante (mmol Trolox/g extracto liofilizado)

A partir de las respuestas observadas en el presente estudio (Tabla 5.1) se estudió la posible influencia de los diferentes factores y sus interacciones. Algunas de las variables del ajuste de los tres modelos cuadráticos mostraron un efecto no significativo (Tabla 5.2.), por lo que fueron eliminadas y a partir de los términos estadísticamente significativos ($p<0,05$) se obtuvieron las ecuaciones 6, 7 y 8.

Tabla 5.2. ANOVA ($p < 0,05$) de la regresión cuadrática múltiple para el rendimiento, cantidad de fenoles totales y capacidad antioxidante de *S. rosmarinus*.

Variable	Rendimiento		Fenoles totales		Capacidad antioxidante	
	Valor	P valor	Valor	P valor	Valor	P valor
Constante	14,10	0,038	-22,54	0,03	2,18	$7,52 \cdot 10^{-11}$
X ₁	0,39	0,138	2,24	$2,22 \cdot 10^{-4}$	$-3,86 \cdot 10^{-3}$	0,66
X ₂	0,73	$9,76 \cdot 10^{-4}$	2,02	$1,81 \cdot 10^{-4}$	$-2,32 \cdot 10^{-2}$	$2,68 \cdot 10^{-3}$
X ₃	9,52	0,143	-22,64	0,12	-0,09	0,44
X ₁ ²	$-3,43 \cdot 10^{-3}$	0,104	$-1,77 \cdot 10^{-2}$	$3,75 \cdot 10^{-4}$	$-1,92 \cdot 10^{-4}$	$1,04 \cdot 10^{-5}$
X ₁ X ₂	$7,22 \cdot 10^{-4}$	0,649	$-1,17 \cdot 10^{-2}$	$1,58 \cdot 10^{-3}$	$1,32 \cdot 10^{-4}$	$8,1 \cdot 10^{-3}$
X ₁ X ₃	-0,03	0,474	0,24	$5,38 \cdot 10^{-3}$	$4,27 \cdot 10^{-3}$	$6,39 \cdot 10^{-4}$
X ₂ ²	$-5,99 \cdot 10^{-3}$	$2,04 \cdot 10^{-4}$	$-8,71 \cdot 10^{-3}$	$7,50 \cdot 10^{-3}$	$1,21 \cdot 10^{-4}$	0,01
X ₂ X ₃	-0,03	0,397	-0,19	$3,24 \cdot 10^{-3}$	$-2,42 \cdot 10^{-3}$	$5,79 \cdot 10^{-3}$
X ₃ ²	-1,06	0,411	1,99	0,23	$-9,51 \cdot 10^{-3}$	0,83

X₁: Ratio (mL solvente/g de muestra); X₂: Concentración etanol (%); X₃: Tiempo (h)

$$Y_1 = 14,1 + 0,73 X_2 - 5,99 \cdot 10^{-3} X_2^2 \quad (\text{Ec. 6})$$

$$Y_2 = -22,54 + 2,24 X_1 + 2,02 X_2 - 1,77 \cdot 10^{-2} X_1^2 - 1,17 \cdot 10^{-2} X_1 X_2 - 0,24 X_1 X_3 - 8,71 \cdot 10^{-3} X_2^2 - 0,19 X_1 X_3 \quad (\text{Ec. 7})$$

$$Y_3 = 2,18 - 2,32 \cdot 10^{-2} X_2 - 1,92 \cdot 10^{-4} X_1^2 + 1,32 \cdot 10^{-4} X_1 X_2 + 4,27 \cdot 10^{-3} X_1 X_3 + 1,21 \cdot 10^{-4} X_2^2 - 2,42 \cdot 10^{-3} X_2 X_3 \quad (\text{Ec. 8})$$

donde Y₁, Y₂ e Y₃, representan el rendimiento, el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante de los extractos de *S. rosmarinus*, respectivamente. Los términos X₁ X₂ y X₃, hacen referencia a la ratio muestra y solvente, la concentración de solvente empleada y la duración del proceso de extracción.

Se observa que el rendimiento (Ecuación 6) únicamente resultó dependiente de la concentración de solvente empleado en el proceso de extracción, es decir, la ratio de muestra vegetal y solvente utilizada y tiempo que dura este proceso resultan indiferentes para calcular esta respuesta. Sin embargo, no lo son para el contenido de compuestos fenólicos o su capacidad antioxidante (Ecuaciones 7 y 8). En el caso de los compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante del romero resultó no significativo el tiempo y su cuadrado, tampoco lo fue la ratio en la capacidad antioxidante. Sin embargo, la interacción de estas variables entre ellas y la concentración de etanol si tuvieron impacto sobre ambos modelos. En general la concentración de etanol fue la variable que más efecto tuvo sobre los tres modelos, al

ser el término estadísticamente significativo con mayor coeficiente de regresión en los tres casos (Tabla 5.2).

Una vez eliminados los términos que no resultaron significativos se obtuvieron los parámetros estadísticos de los tres modelos mostrados en la tabla 5.3.

Tabla 5.3. Parámetros estadísticos de los modelos de optimización del rendimiento, contenido en fenoles totales y capacidad antioxidante de *S. rosmarinus*.

Parámetros estadísticos	Rendimiento	Fenoles totales	Capacidad antioxidante
R ²	0,567	0,607	0,629
R ² ajustado	0,533	0,526	0,569
Error estándar	3,347	8,864	0,137
Coefficiente de variación	10,191	9,773	11,342
Nivel de significancia	1,897·10 ⁻⁵	4,289·10 ⁻¹¹	5,920·10 ⁻⁹

Los coeficientes de determinación (R² y R² ajustado) en los tres modelos se encuentran alejados de la unidad, lo que nos indica que los modelos presentan una capacidad limitada para ajustarse a los datos y explicar las diferencias observadas en la variable dependiente (Tabla 5.3). Este suceso tiene lugar especialmente en el caso del modelo del rendimiento, posiblemente debido a una menor muestra de datos debida a su falta de significancia. A pesar de ello, el test ANOVA (p<0,05) resultó significativo para las tres respuestas, lo que indica que los modelos son capaces de explicar de forma confiable la variabilidad entre sus datos y a su vez aproximar la relación entre sus variables.

Las diferencias entre los coeficientes R² y R² ajustado fueron menores de 0,05 en el caso del modelo del rendimiento y en el de la capacidad antioxidante. Sin embargo, para el contenido de fenoles totales fue algo superior, pero sin llegar a 0,1, lo que indica una aproximación sin sobreajuste. Se puede observar que existen diferencias en la distribución de los valores estimados por el modelo y de los obtenidos experimentalmente en torno a la línea de equivalencia para las tres respuestas (Figura 5.1). En el caso del rendimiento se aprecia una evidente falta de homogeneidad (Figura 5.1 A y B) posiblemente causada por la falta de términos en la ecuación que modeliza la respuesta. En comparación con el caso anterior, el modelo capaz de predecir el contenido de compuestos fenólicos muestra una mejor estimación en las zonas centrales del rango estudiado (Figura 5.1 C), lo que corresponde con unos residuos próximos a cero (Figura 5.1 D). La capacidad antioxidante también mostró unos valores que en condiciones cercanas a los puntos centrales se aproximaban a la

línea de tendencia (Figura 5.1 E). Por otro lado, teniendo en cuenta los valores de los residuos, estos se encuentran de forma dispersa y alejada del valor cero, lo que nos indica una falta de ajuste (Figura 5.1 F).

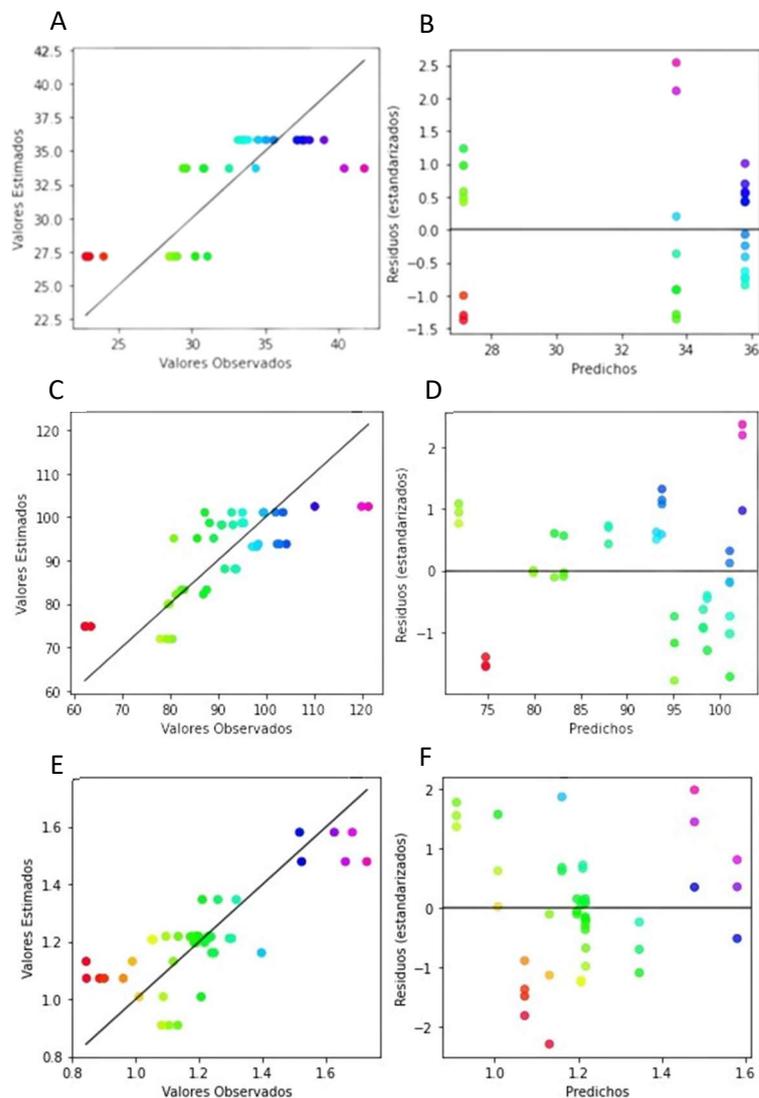


Figura 5.1. Correlación entre los valores estimados y experimentales para el modelo de optimización del rendimiento (%) (A, B), el contenido de fenoles totales (mg GAE/g extracto liofilizado) (C, D) y capacidad antioxidante (mmol Trolox/g extracto liofilizado) (E, F) de *S. rosmarinus*.

En concreto, la concentración de solvente influyó cuadráticamente sobre el rendimiento en el proceso de extracción (Figura 5.2). Al verse el rendimiento únicamente influenciado por esta variable, la gráfica obtenida no puede representarse en forma de superficie de respuesta, pero se observa que el máximo rendimiento se obtiene empleando en la extracción una concentración de etanol del 60%, aunque concentraciones entre el 50 y 70% también lograron alcanzar rendimientos elevados.

Musolino et al. (2023) obtuvieron un mayor rendimiento de *S. rosmarinus* utilizando concentraciones de etanol-agua entre 50 y 80% en comparación con el uso de estos solventes puros.

El tiempo y la ratio de solvente y muestra empleados en esta etapa no se relacionaron con el rendimiento obtenido, pero el estudio realizado por Hosseini et al. (2018) concluye que el tiempo y la temperatura son significativos para el modelo de extracción, aunque entre 30 min y 5 h de extracción se mantuvo invariable el rendimiento del proceso. En cambio, en el caso de la ratio de muestra solvente si observan un efecto sobre el rendimiento del extracto de romero, que se ve favorecido usando ratios superiores a 20 mL de solvente/g de muestra, a diferencia de lo obtenido en el presente estudio.

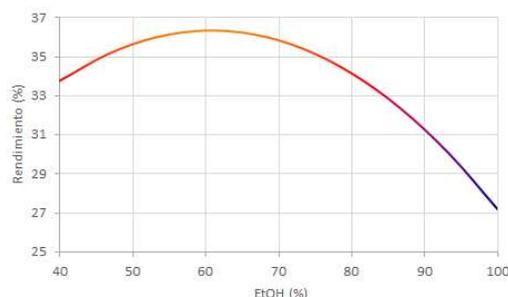


Figura 5.2. Rendimiento para la especie *S. rosmarinus* en función de la concentración de etanol a partir del modelo de extracción Soxhlet

El contenido de fenoles totales también presentó una relación cuadrática con la concentración de solvente, siendo máxima en valores entre el 40-60%, así como con la ratio de muestra y solvente empleada (Figura 5.3). En el caso de la concentración de solvente, Vieira et al. (2019) obtuvieron valores cercanos a nuestro óptimo con el objetivo de maximizar el contenido en compuestos fenólicos totales, concluyendo que la concentración de etanol a emplear se encontraba en torno al 50%.

La ratio de muestra y solvente empleada, maximizó el contenido de compuestos fenólicos en valores de entre 1:50 y 1:60 (g de muestra/mL solvente), al igual que en el estudio llevado a cabo por Hosseini et al., (2018), en el que cuanto mayor era el volumen de solvente empleado por gramo de muestra vegetal, mayor contenido de compuestos fenólicos se obtenía. Esto puede deberse a que al aumentar el volumen que ejerce fuerza sobre la muestra se aumenta la presión osmótica y el área de contacto, lo que puede favorecer la transmisión de compuestos bioactivos al solvente. El tiempo tuvo un comportamiento singular con respecto a la concentración de etanol y la ratio empleada. A concentraciones de etanol bajas y a volúmenes de

solvente elevadas se observó que conforme mayor era el tiempo de extracción mayor contenido en compuestos fenólicos se obtenía.

Por otro lado, cuanto mayores fueron las concentraciones de etanol y menores volúmenes de solvente se usaron en la extracción, ocurría el efecto contrario, conforme avanzaba el tiempo menos fenoles eran extraídos. Por lo que, en valores intermedios de concentración de etanol y de solvente empleado, el tiempo no mostraba un efecto notable. Estudios como el de Hosseini et al. (2018) afirman que unos tiempos de extracción con calor más prolongados favorecen la obtención de un mayor contenido de compuestos fenólicos, mientras que al mismo tiempo también se asocia una mayor degradación de los fenoles debido a su exposición al calor.

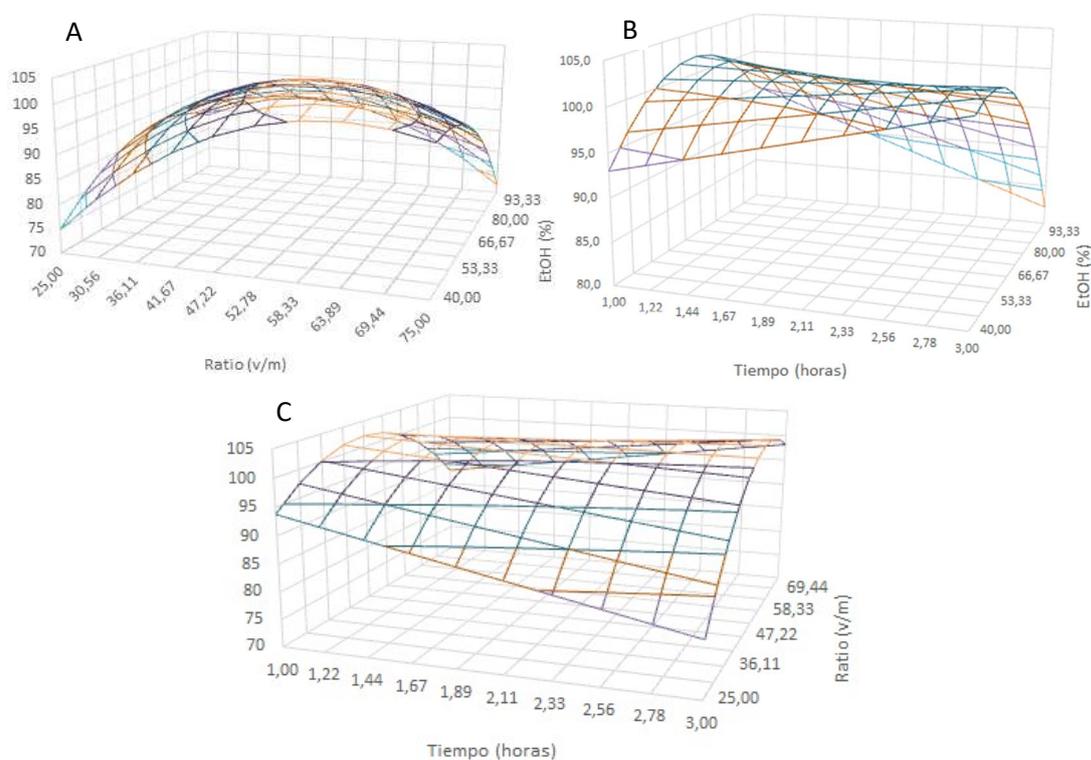


Figura 5.3. Gráficas de superficie 3D elaboradas a partir del modelo de extracción Soxhlet para la optimización de la cantidad de fenoles totales (mg GAE/g extracto liofilizado) de la especie *S. rosmarinus*. Interacción entre la ratio de muestra y solvente y la concentración de solvente a las 2 h de extracción (A); entre el tiempo y la concentración de solvente con una ratio de 50 mL de solvente por gramo de muestra seca (B); y entre el tiempo y la ratio de muestra y solvente al 70% de etanol (C).

En el caso de la capacidad antioxidante (Figura 5.4) se observa un efecto cuadrático tanto de la ratio de solvente y muestra empleada, como de la concentración de solvente, mientras que en el tiempo se observa una relación lineal. La máxima capacidad antioxidante se consigue a partir de ratios en torno a 1:35 (g de muestra/mL

solvente). Así mismo, la concentración de etanol presenta un claro efecto sobre la capacidad antioxidante a valores bajos, en torno al 40%. Por otro lado, el tiempo muestra un comportamiento similar al caso de los fenoles totales, donde a concentraciones bajas de etanol y de solvente tienen lugar efectos antagónicos. A pesar de que a volúmenes de solvente intermedios, 40 mL/g muestra, el tiempo no provoca ningún efecto significativo, si afecta notablemente a concentraciones bajas de etanol, donde a tiempos prolongados se obtiene el máximo efecto antioxidante. Es de esperar que el comportamiento que se observe en la capacidad antioxidante sea similar a la del contenido en fenoles totales, debido que son este tipo de compuestos a los que se les atribuye gran parte del efecto antioxidante (Hosseini et al., 2018).

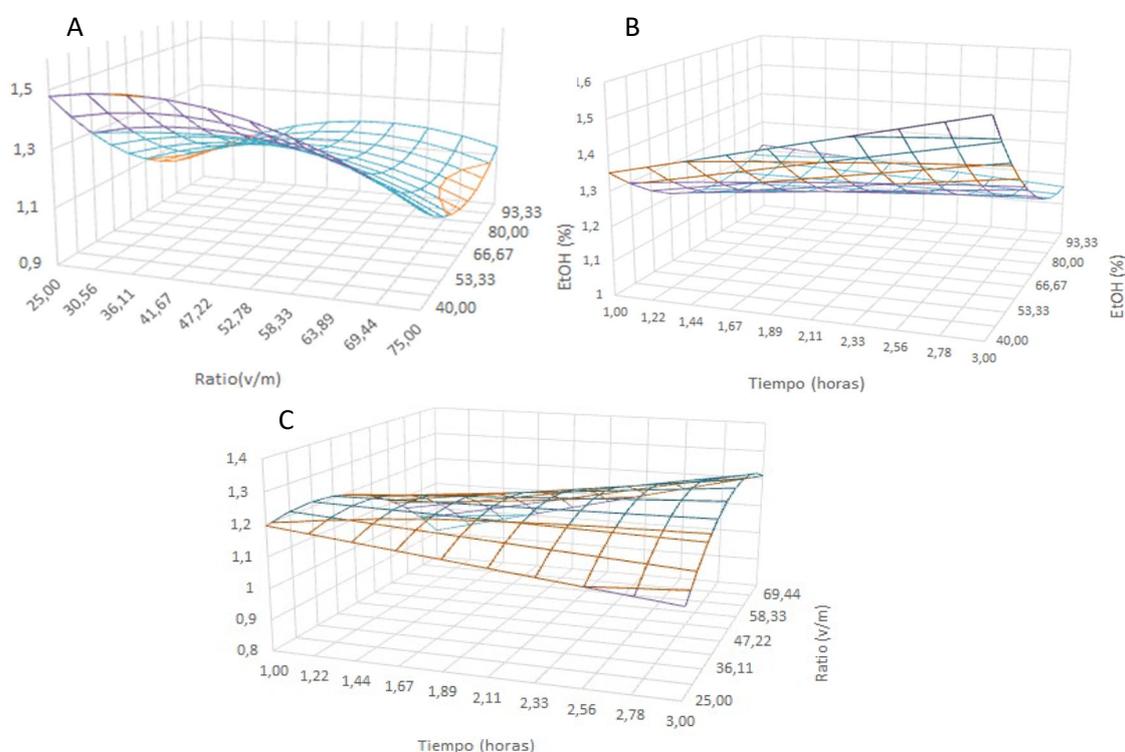


Figura 5.4. Gráficas de superficie 3D elaboradas a partir del modelo de extracción Soxhlet para la optimización de la capacidad antioxidante (mmol Trolox/g extracto liofilizado) de la especie *S. rosmarinus*. Interacción entre la ratio de muestra y solvente y la concentración de solvente a las 2 h de extracción (A); entre el tiempo y la concentración de solvente con una ratio de 50 mL de solvente por gramo de muestra seca (B); y entre el tiempo y la ratio de muestra y solvente al 70% de etanol (C).

La optimización para todas las variables dependientes en conjunto, según el modelo, y los valores de las variables independientes que hacen máximas estas respuestas se muestran en la tabla 5.4, así como los resultados experimentales hallados tras la extracción en dichas condiciones. Los valores máximos alcanzables mediante estos modelos para el rendimiento, contenido de fenoles totales y capacidad

antioxidante fueron de 36,32%, 109,76 mg GAE/g y 1,581 mmol Trolox/g extracto liofilizado, respectivamente. De forma general, las condiciones obtenidas mediante la maximización de los tres modelos se aproximan a estos valores.

Tabla 5.4. Parámetros estadísticos de los modelos de optimización del rendimiento, contenido en fenoles totales y capacidad antioxidante de *S. rosmarinus*. Intervalo de confianza de $\alpha=0,05$, $n=3$ (Y_1) y $n=6$ (Y_2 e Y_3).

Ensayo	Variables independientes			Variables dependientes		
	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	Y ₂	Y ₃
Modelado	54	61	3	36,32	104,06	1,34
Experimental	54	61	3	37,00 ± 1,05	100,98 ± 7,87	1,37 ± 0,19

X₁: Ratio (mL solvente/g de muestra); X₂: Concentración etanol (%); X₃: Tiempo (h); Y₁: Rendimiento (%); Y₂: Contenido en fenoles totales (mg GAE/g extracto liofilizado); Y₃: Capacidad antioxidante (mmol Trolox/g extracto liofilizado)

A pesar de la falta de ajuste, se puede observar que los valores experimentales obtenidos bajo las condiciones óptimas fueron muy similares a los estimados, indicando la capacidad de predicción del mismo dentro de los rangos ensayados. Por ese motivo, la validación de los modelos de las respuestas estudiadas junto con su optimización ha resultado exitosa.

5.1.2. Influencia de las condiciones de extracción estudiadas y optimización de las mismas para obtener extractos bioactivos de la especie *Thymus mastichina*

En el caso de la especie *T. mastichina* los valores obtenidos a partir del diseño experimental descrito se recogen en la Tabla 5.5. En esta tabla se aprecian las medias e intervalos al 95% de confianza de las tres respuestas analizadas: rendimiento, contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante.

Los valores obtenidos experimentalmente para el rendimiento (Figura 5.5) se encuentran entre 18,36 y 25,61%, superando en parte lo establecido por la bibliografía consultada, donde le atribuyen a la especie *T. mastichina* valores entre 8,51 y 22,01% para extractos etanólicos (Albano y Miguel, 2011; Asensio-Vegas et al., 2018; Taghouti et al., 2019a). Lo mismo ocurre en el caso de la capacidad antioxidante, donde se observan entre 1,16 y 2,01 mmol Trolox/g planta seca, también superior a lo presente en diversos estudios, donde se encuentran valores de 0,08 hasta 1,48 mmol Trolox/g planta seca (Taghouti et al., 2019a; Taghouti et al., 2019b).

En el caso del contenido de fenoles totales los valores obtenidos experimentalmente fueron de 97,23 hasta 165,23 mg GAE/ g extracto seco, ajustándose a lo esperable según Barros, Carvalho y Ferreira (2010) y Asensio-Vegas et al. (2018) que obtuvieron valores entre 109,09 y 168,96 mg GAE/g extracto seco. En otras especies de tomillo como el *T. vulgaris* se han conseguido extraer entre 131 y 262 mg GAE/g extracto seco.

Tabla 5.5. Diseño experimental y respuesta de las variables dependientes en la extracción de *T. mastichina*. Intervalo de confianza de $\alpha=0,05$, $n=3$ (Y_1) y $n=6$ (Y_2 e Y_3).

Ensayo	Variables independientes			Variables dependientes		
	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	Y ₂	Y ₃
1	50	40	1	20,69 ± 1,02	122,12 ± 5,38	1,14 ± 0,14
2	50	100	1	18,36 ± 0,45	103,77 ± 2,82	1,14 ± 0,05
3	75	70	1	21,07 ± 1,48	155,26 ± 3,37	1,52 ± 0,04
4	25	70	1	18,63 ± 0,32	123,96 ± 4,26	1,31 ± 0,03
5	25	100	2	19,11 ± 1,41	97,23 ± 2,96	1,40 ± 0,08
6	50	70	2	25,61 ± 0,89	163,82 ± 11,01	2,01 ± 0,01
7	50	70	2	24,55 ± 0,66	156,48 ± 4,48	1,91 ± 0,10
8	50	70	2	25,18 ± 0,75	165,23 ± 11,46	1,89 ± 0,12
9	75	100	2	21,86 ± 0,92	122,26 ± 6,38	1,20 ± 0,02
10	75	40	2	18,54 ± 0,26	148,82 ± 1,10	1,41 ± 0,05
11	25	40	2	18,40 ± 1,12	148,30 ± 5,91	1,25 ± 0,05
12	25	70	3	25,05 ± 0,92	117,53 ± 3,40	1,53 ± 0,05
13	50	100	3	20,75 ± 0,32	104,20 ± 3,51	1,65 ± 0,08
14	50	40	3	22,12 ± 1,82	135,08 ± 2,74	1,71 ± 0,03
15	75	70	3	19,53 ± 1,03	132,12 ± 6,86	1,53 ± 0,10

X₁: Ratio (mL solvente/g de muestra); X₂: Concentración etanol (%); X₃: Tiempo (h); Y₁: Rendimiento (%); Y₂: Contenido en fenoles totales (mg GAE/g extracto liofilizado); Y₃: Capacidad antioxidante (mmol Trolox/g extracto liofilizado)

Los resultados de los análisis estadísticos para la optimización del proceso de extracción con el objetivo de maximizar las respuestas objetivo de la especie *T. mastichina* se muestran en la tabla 5.6.

Tabla 5.6. ANOVA ($p < 0,05$) de la regresión cuadrática múltiple para el rendimiento, cantidad de fenoles totales y capacidad antioxidante de *T. mastichina*.

Variable	Rendimiento		Fenoles totales		Capacidad antioxidante	
	Valor	P valor	Valor	P valor	Valor	P valor
Constante	-16,98	$1,48 \cdot 10^{-3}$	-39,20	$6,60 \cdot 10^{-3}$	-2,50	$1,03 \cdot 10^{-8}$
X ₁	0,56	$2,48 \cdot 10^{-6}$	1,10	0,012	$5,32 \cdot 10^{-2}$	$1,95 \cdot 10^{-9}$
X ₂	0,47	$6,78 \cdot 10^{-6}$	2,85	$3,20 \cdot 10^{-9}$	$5,82 \cdot 10^{-2}$	$2,88 \cdot 10^{-11}$
X ₃	10,52	$1,02 \cdot 10^{-4}$	85,34	$1,77 \cdot 10^{-11}$	0,89	$6,38 \cdot 10^{-7}$
X ₁ ²	$-4,08 \cdot 10^{-3}$	$6,46 \cdot 10^{-5}$	$-1,32 \cdot 10^{-2}$	$9,40 \cdot 10^{-4}$	$-4,41 \cdot 10^{-4}$	$6,26 \cdot 10^{-9}$
X ₁ X ₂	$8,72 \cdot 10^{-4}$	0,17	$8,08 \cdot 10^{-3}$	$6,22 \cdot 10^{-3}$	$-1,19 \cdot 10^{-4}$	0,01
X ₁ X ₃	$-7,75 \cdot 10^{-2}$	$2,92 \cdot 10^{-4}$	-0,14	0,11	$-2,23 \cdot 10^{-3}$	0,10
X ₂ ²	$-3,39 \cdot 10^{-3}$	$6,23 \cdot 10^{-6}$	$-2,71 \cdot 10^{-2}$	$2,07 \cdot 10^{-13}$	$-3,77 \cdot 10^{-4}$	$4,40 \cdot 10^{-11}$
X ₂ X ₃	$1,13 \cdot 10^{-2}$	0,46	-0,13	0,08	$-4,50 \cdot 10^{-4}$	0,68
X ₃ ²	-1,41	$1,26 \cdot 10^{-2}$	-21,71	$6,33 \cdot 10^{-12}$	-0,18	$1,58 \cdot 10^{-5}$

X₁: Ratio (mL solvente/g de muestra); X₂: Concentración etanol (%); X₃: Tiempo (horas)

Como se puede constatar en la tabla 5.6 existen términos que no tuvieron un efecto significativo en ninguno de los tres modelos como fueron las interacciones de las variables independientes: concentración de solvente y tiempo de extracción (X₂X₃). Además, otras interacciones como la de la concentración de solvente y la ratio (X₁X₂) tampoco resultaron significativas para la optimización del rendimiento. En el caso del contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante, se determinó que la relación entre la ratio y el tiempo (X₁X₃) no fue significativa. En los tres modelos, el tiempo y su cuadrado (X₃, X₃²) resultaron estar especialmente relacionados de forma positiva con las tres respuestas al presentar un coeficiente de regresión alto (Tabla 5.6).

Las siguientes ecuaciones (Ecuación 9, 10 y 11) permiten estimar las variables dependientes para cualquier valor de las condiciones de extracción dentro de los rangos estudiados.

$$Y_1 = - 16,98 + 0,56 X_1 + 0,47 X_2 + 10,52 X_3 - 4,08 \cdot 10^{-3} X_1^2 - 7,75 \cdot 10^{-2} X_1 X_3 - 3,39 \cdot 10^{-3} X_2^2 - 1,41 X_3^2$$

(Ec. 9)

$$Y_2 = - 39,20 + 1,10 X_1 + 2,85 X_2 + 85,34 X_3 - 1,32 \cdot 10^{-2} X_1^2 + 8,08 \cdot 10^{-3} X_1 X_2 - 2,71 \cdot 10^{-2} X_2^2 - 21,71 X_3^2$$

(Ec. 10)

$$Y_3 = - 2,50 + 5,32 \cdot 10^{-2} X_1 + 5,82 \cdot 10^{-2} X_2 + 0,89 X_3 - 4,41 \cdot 10^{-4} X_1^2 - 1,19 \cdot 10^{-4} X_1 X_2 - 3,77 \cdot 10^{-4} X_2^2 - 0,18 X_3^2$$

(Ec.11)

donde Y₁, Y₂ e Y₃, representan el rendimiento, el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante de la especie *T. mastichina*, respectivamente. Los términos

X_1 , X_2 y X_3 , hacen referencia a la ratio muestra y solvente, la concentración de solvente empleada y la duración del proceso de extracción.

En las tres respuestas estudiadas, su modelización obtuvo un comportamiento cuadrático, como se puede observar en sus ecuaciones resultantes tras la eliminación de aquellos términos que resultaban no significativos (Ecuación 9, 10 y 11). Los parámetros estadísticos que se obtuvieron se encuentran recogidos en tabla 5.7.

Tabla 5.7. Parámetros estadísticos de los modelos de optimización del rendimiento, contenido en fenoles totales y capacidad antioxidante de *T. mastichina*.

Parámetros estadísticos	Rendimiento	Fenoles totales	Capacidad antioxidante
R^2	0,783	0,877	0,846
R^2 ajustado	0,713	0,857	0,815
Error estándar	1,338	8,114	0,115
Coefficiente de variación	6,394	6,101	7,778
Nivel de significancia	$1,08 \cdot 10^{-4}$	$6,735 \cdot 10^{-7}$	$2,131 \cdot 10^{-7}$

En los tres casos los ajustes resultaron estadísticamente significativos, aunque los coeficientes R^2 y R^2 ajustado muestran un valor bajo, especialmente en el caso del rendimiento, pero superior al obtenido en el caso del romero. La lejanía respecto al valor de la unidad nos demuestra que existe cierta diferencia entre los valores obtenidos experimentalmente y los estimados por el modelo. Los valores se encuentran alejados de la línea de equivalencia de la respuesta del rendimiento (Figura 5.5 A), al igual que se observaba en su R^2 y R^2 ajustado. En el caso del contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante los valores estimados respecto a los observados se encuentran más próximos entre sí que en el modelo del rendimiento (Figura 5.5 C y E). Por otro lado, a pesar de que el modelo que predice la capacidad antioxidante es aquel con menor error estándar, los tres modelos presentan una clara dispersión de los datos, como podemos observar en los residuos (Figura 5.5 B, D, F).

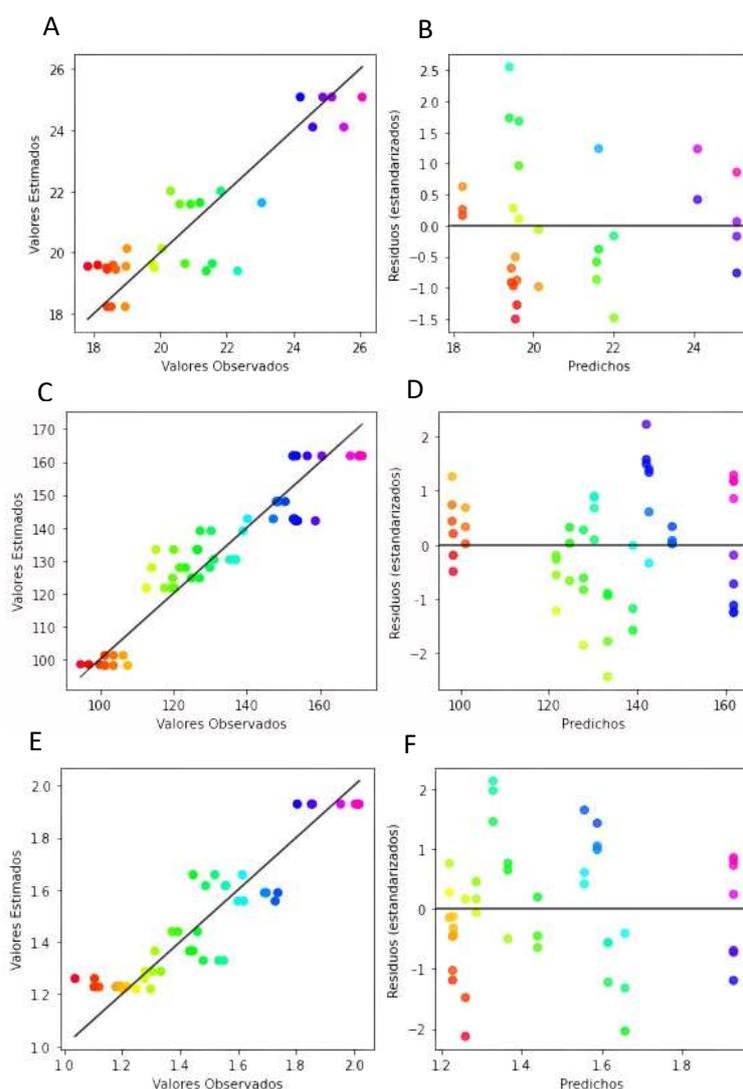


Figura 5.5. Correlación entre los valores estimados y experimentales para el modelo de optimización del rendimiento (%) (A, B), el contenido de fenoles totales (mg GAE/g extracto liofilizado) (C, D) y capacidad antioxidante (mmol Trolox/g extracto liofilizado) (E, F) de *T. mastichina*.

La influencia de las variables independientes y sus interacciones sobre las respuestas de interés se puede observar mediante los gráficos de superficie de respuesta obtenidos a partir de las ecuaciones ya mencionadas.

En el caso del rendimiento se observa una tendencia cuadrática en las tres variables independientes: ratio muestra y solvente, concentración solvente y tiempo de extracción, aunque más influyente en el caso de la concentración de etanol y ratio. Como se puede observar en las gráficas superficie de respuesta (Figura 5.6 A y B), la concentración de etanol maximiza el rendimiento cuanto más próximo se encuentra al 60%. En especies del mismo género *Thymus* como el *T. fontanesii* se obtuvo un valor

óptimo de concentración de etanol de 50%, similar a lo observado en este estudio (Nabet et al., 2019). De forma similar a la concentración de etanol ocurre en el caso de la ratio, donde valores intermedios a los estudiados, cercanos al 50 mL solvente por gramo de muestra es donde se consigue el mayor rendimiento del extracto de *T. mastichina*.

Por otro lado, el tiempo maximizó el rendimiento, alcanzando los valores máximos en valores próximos a las 3 h. Vergara-Salinas, Pérez-Jiménez, Torres, Agosin y Pérez-Correa (2012) determinaron que en la extracción de tomillo común (*T. vulgaris*) el tiempo entre los 5 y 30 min no tenía un efecto significativo sobre el rendimiento obtenido a partir de la extracción, a diferencia de la temperatura que, si mostraba diferencias, especialmente entre los 100 y 200 °C, donde se duplicaba el rendimiento.

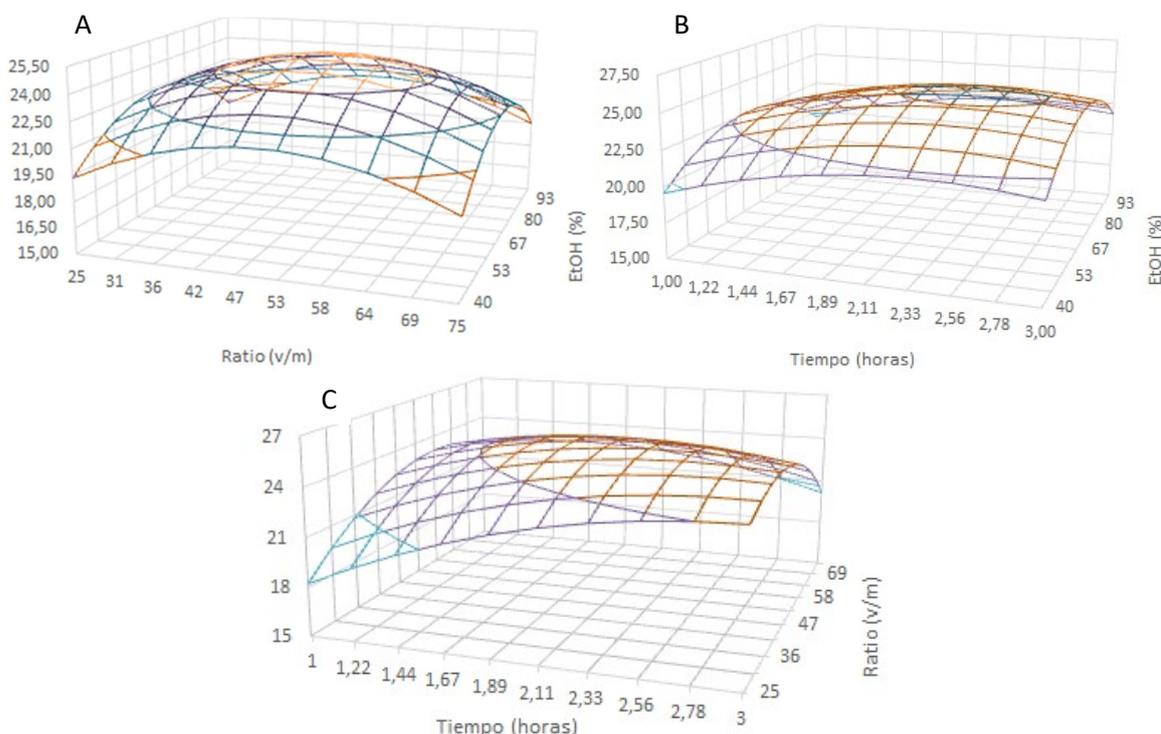


Figura 5.6. Gráficas de superficie 3D elaboradas a partir del modelo de extracción Soxhlet para la optimización del rendimiento (%) de la especie *T. mastichina*. Interacción entre la ratio de muestra y solvente y la concentración de solvente a las 2 h de extracción (A); entre el tiempo y la concentración de solvente con una ratio de 50 mL de solvente por gramo de muestra seca (B); y entre el tiempo y la ratio de muestra y solvente al 70% de etanol (C).

Del mismo modo que se observaba en el rendimiento, en el caso del contenido de compuestos fenólicos, las tres variables que se estudiaron presentaron un comportamiento cuadrático (Figura 5.7). En este caso, el tiempo presentó una relación más marcada que en el rendimiento y a diferencia de este, el tiempo más favorable se

encontró en valores más bajos, cercanos a las 2 h. La ratio de solvente empleado respecto a la muestra vegetal, presentó una menor importancia, especialmente en extracciones con una concentración de etanol alrededor del 40%. Sin embargo, la acción del volumen de solvente empleado se vio más afectada por el tiempo de extracción, obteniéndose un mayor contenido en fenoles usando volúmenes en torno a los 50 mL/g de muestra.

Una concentración elevada de etanol fue desfavorable para maximizar el contenido de estos compuestos, especialmente con volúmenes bajos de solvente y tiempos prolongados. Por otro lado, concentraciones medias (entre el 50 y 70%) mostraron una acción beneficiosa. Vieira et al. (2019) estudiaron la influencia de la concentración de etanol sobre el contenido de fenoles totales en tomillo, en este caso *T. vulgaris*, y al igual que en nuestro estudio puede observarse que en concentraciones cercanas al 50% tiene lugar la máxima extracción de estos compuestos.

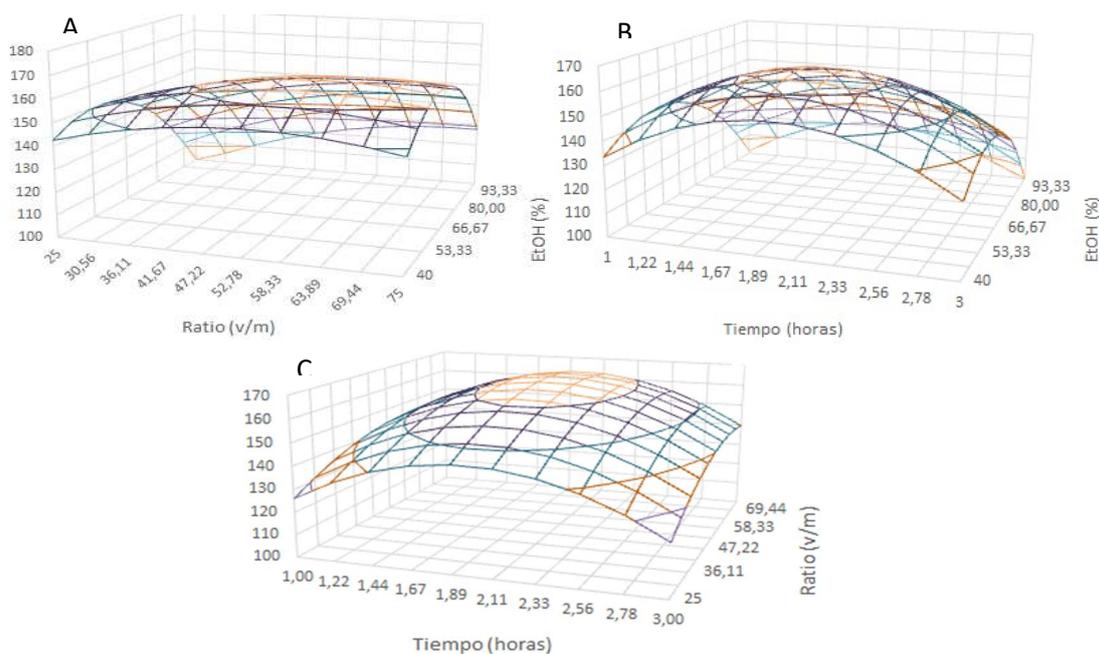


Figura 5.7. Gráficas de superficie 3D elaboradas a partir del modelo de extracción Soxhlet para la optimización de la cantidad de fenoles totales (mg GAE/g extracto liofilizado) de la especie *T. mastichina*. Interacción entre la ratio de muestra y solvente y la concentración de solvente a las 2 h de extracción (A); entre el tiempo y la concentración de solvente con una ratio de 50 mL de solvente por gramo de muestra seca (B); y entre el tiempo y la ratio de muestra y solvente al 70% de etanol (C).

En la figura 5.8 se muestra el efecto de los diferentes factores sobre la capacidad antioxidante de los extractos *T. mastichina*. De nuevo, la ratio de solvente y

muestra y la concentración de solvente mostraron un comportamiento cuadrático, aunque más acentuado que en el caso del tiempo. El uso de un volumen de solvente en torno a 50 mL/g y concentraciones cercanas a los puntos centrales del estudio (70%) permitieron obtener un extracto con mayor capacidad antioxidante. Taghouti et al. (2019b) obtuvieron extractos con mayor capacidad antioxidante extrayendo *T. mastichina* con etanol 80% que utilizando agua como solvente. El tiempo, al igual que ocurría con el rendimiento, presenta una relación positiva sobre la capacidad antioxidante conforme este es más prolongado. Además, muestra un efecto similar respecto a la ratio y concentración de solvente, exhibiendo la mayor capacidad antioxidante con extracciones de 2,5 h de duración.

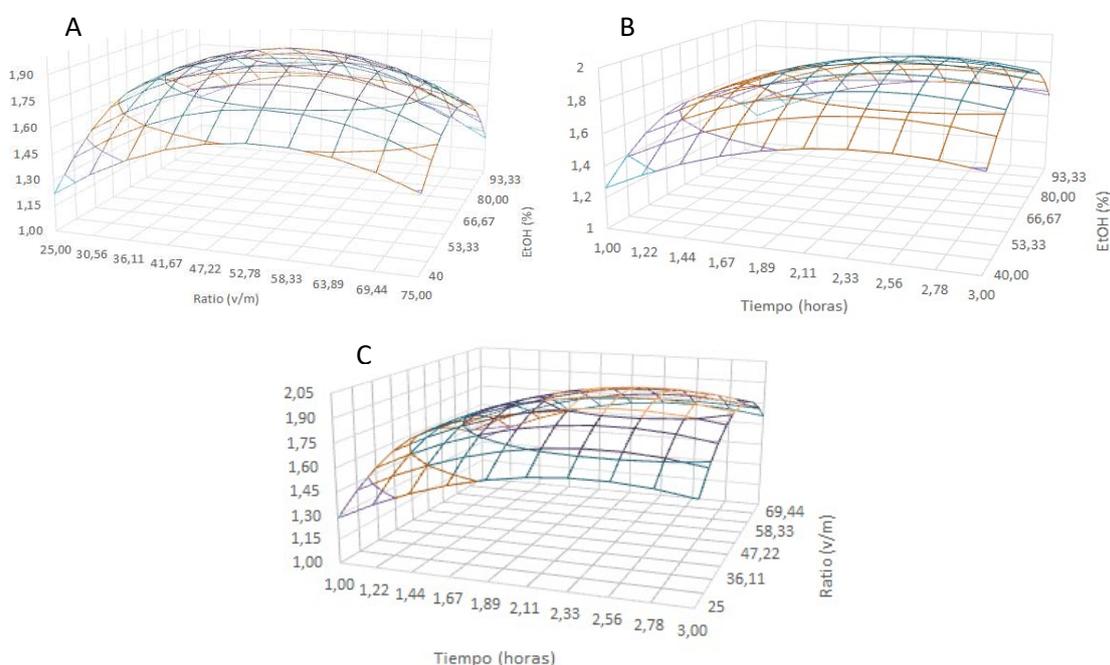


Figura 5.8. Gráficas de superficie 3D elaboradas a partir del modelo de extracción Soxhlet para la optimización de la capacidad antioxidante (mmol Trolox/g extracto liofilizado) de la especie *T. mastichina* Interacción entre la ratio de muestra y solvente y la concentración de solvente a las 2 h de extracción (A); entre el tiempo y la concentración de solvente con una ratio de 50 mL de solvente por gramo de muestra seca (B); y entre el tiempo y la ratio de muestra y solvente al 70% de etanol (C).

A partir de las condiciones óptimas para cada variable dependiente y sus modelos y variables independientes, se obtuvieron las condiciones deseadas para maximizar las variables dependientes en su conjunto. Los valores máximos alcanzables mediante los tres modelos fueron de 25,32% para el rendimiento, 165,97 mg GAE/g en el caso del contenido de compuestos fenólicos y por último, 1,97 mmol Trolox/g extracto liofilizado para la capacidad antioxidante. Los valores esperados para las respuestas en condiciones óptimas se aproximan a los máximos de cada modelo. En la tabla 5.8, se recogen los valores de las variables independientes que maximizan

las respuestas presentes y sus valores estimados, así como las condiciones que se llevaron a cabo de forma experimental y los resultados obtenidos.

Tabla 5.8. Parámetros estadísticos de los modelos de optimización del rendimiento, contenido en fenoles totales y capacidad antioxidante de *T. mastichina*. Intervalo de confianza de $\alpha=0,05$, $n=3$ (Y_1) y $n=6$ (Y_2 e Y_3).

Ensayo	Variables independientes			Variables dependientes		
	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	Y ₂	Y ₃
Modelado	51	69	2,46	25,20	157,51	1,97
Experimental	51	69	2,50	26,04 ± 1,19	150,36 ± 7,61	1,88 ± 0,13

X₁: Ratio (mL solvente/g de muestra); X₂: Concentración etanol (%); X₃: Tiempo (h); Y₁: Rendimiento (%); Y₂: Contenido en fenoles totales (mg GAE/g extracto liofilizado); Y₃: Capacidad antioxidante (mmol Trolox/g extracto liofilizado)

El rango de valores obtenidos experimentalmente a partir de las condiciones determinadas como óptimas se relacionó con lo esperable según las respuestas calculadas a partir de los modelos de respuesta. Por esta razón el método empleado para llevar a cabo la extracción y optimización para el caso de *T. mastichina* resultó reproducible experimentalmente.

5.1.3. Influencia de las condiciones de extracción estudiadas y optimización de las mismas para obtener extractos bioactivos de la especie *Juniperus communis*

En el caso de la última especie estudiada, *Juniperus communis*, el diseño experimental llevado a cabo junto con los valores obtenidos experimentalmente se recogen la tabla 5.9.

Los valores obtenidos de forma experimental para el rendimiento, contenido de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante estuvieron comprendidos entre un amplio rango en función de las condiciones de extracción empleadas, estando los mismos entre 5,16-22,03%, 38,39-96,38 mg GAE/g extracto liofilizado y 0,84 y 2,77 mmol Trolox/g extracto liofilizado, respectivamente. Por lo general, en el caso del rendimiento y el contenido en compuestos fenólicos totales los valores obtenidos se encuentran dentro, y en algunos casos por encima, de los resultados presentados por otros estudios, en los que lograron valores de rendimiento de 4,08 hasta 7,33% y de 6,87 hasta 56,15 mg GAE/g extracto seco para el caso del contenido de fenoles totales (Elmastaş, Gülçin, Beydemir, Küfrevioğlu y Aboul-Enein, 2006; Parzhanova, Petkova, Ivanov y Ivanova, 2018; Fejér et al., 2020; Belov et al., 2023).

Tabla 5.9. Diseño experimental y respuesta de las variables dependientes en la extracción de *J. communis*. Intervalo de confianza de $\alpha=0,05$, $n=3$ (Y1) y $n=6$ (Y2 e Y3).

Ensayo	Variables independientes			Variables dependientes		
	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	Y ₂	Y ₃
1	50	40	1	13,99 ± 0,55	68,08 ± 0,68	0,95 ± 0,03
2	50	100	1	22,03 ± 1,85	41,54 ± 2,22	2,25 ± 0,04
3	75	70	1	18,20 ± 0,13	58,76 ± 4,93	2,45 ± 0,03
4	25	70	1	13,08 ± 0,70	96,38 ± 5,80	2,77 ± 0,10
5	25	100	2	20,32 ± 1,98	63,99 ± 2,37	2,56 ± 0,04
6	50	70	2	12,43 ± 1,71	55,49 ± 2,23	1,03 ± 0,08
7	50	70	2	12,40 ± 1,68	52,95 ± 1,41	0,84 ± 0,04
8	50	70	2	11,97 ± 0,59	53,30 ± 2,03	0,85 ± 0,06
9	75	100	2	14,89 ± 1,61	38,39 ± 3,23	1,86 ± 0,22
10	75	40	2	17,79 ± 2,26	80,64 ± 0,66	2,61 ± 0,05
11	25	40	2	11,48 ± 0,37	81,22 ± 1,15	2,67 ± 0,07
12	25	70	3	16,47 ± 0,38	60,99 ± 2,99	2,48 ± 0,05
13	50	100	3	11,85 ± 0,21	56,65 ± 0,65	1,32 ± 0,11
14	50	40	3	14,56 ± 0,77	84,37 ± 5,99	1,72 ± 0,07
15	75	70	3	5,16 ± 0,37	78,66 ± 2,49	2,59 ± 0,12

X₁: Ratio (mL solvente/g de muestra); X₂: Concentración etanol (%); X₃: Tiempo (h); Y₁: Rendimiento (%); Y₂: Contenido en fenoles totales (mg GAE/g extracto liofilizado); Y₃: Capacidad antioxidante (mmol Trolox/g extracto liofilizado)

La influencia de las diferentes variables independientes se evaluó ajustando los datos experimentales a ecuaciones polinomiales de segundo orden según un modelo cuadrático, cuyo análisis se recoge en la tabla 5.10.

Tabla 5.10. ANOVA ($p<0,05$) de la regresión cuadrática múltiple para el rendimiento, cantidad de fenoles totales y capacidad antioxidante de *J. communis*.

Variable	Rendimiento		Fenoles totales		Capacidad antioxidante	
	Valor	P valor	Valor	P valor	Valor	P valor
Constante	-12,90	$4,02 \cdot 10^{-6}$	194,27	$3,53 \cdot 10^{-22}$	6,92	$1,35 \cdot 10^{-21}$
X ₁	0,59	$9,52 \cdot 10^{-12}$	-2,49	$2,76 \cdot 10^{-11}$	-0,20	$9,02 \cdot 10^{-23}$
X ₂	$-5,85 \cdot 10^{-2}$	0,44	$-4,78 \cdot 10^{-2}$	0,65	$2,54 \cdot 10^{-3}$	0,78
X ₃	12,58	$1,73 \cdot 10^{-10}$	-58,34	$1,11 \cdot 10^{-10}$	-0,81	$3,75 \cdot 10^{-3}$
X ₁ ²	$1,07 \cdot 10^{-3}$	0,12	$1,80 \cdot 10^{-2}$	$3,29 \cdot 10^{-9}$	$2,04 \cdot 10^{-3}$	$2,74 \cdot 10^{-27}$
X ₁ X ₂	$-4 \cdot 10^{-3}$	$3,66 \cdot 10^{-8}$	$-9,23 \cdot 10^{-3}$	$7,35 \cdot 10^{-18}$	$-2,03 \cdot 10^{-4}$	$2,54 \cdot 10^{-3}$
X ₁ X ₃	-0,17	$2,71 \cdot 10^{-11}$	0,55	$1,79 \cdot 10^{-11}$	$4,27 \cdot 10^{-3}$	$3,43 \cdot 10^{-2}$
X ₂ ²	$3,08 \cdot 10^{-3}$	$4,24 \cdot 10^{-12}$	$7,36 \cdot 10^{-4}$	0,68	$2,81 \cdot 10^{-4}$	$9,74 \cdot 10^{-12}$
X ₂ X ₃	$-9,18 \cdot 10^{-2}$	$1,58 \cdot 10^{-7}$	$2,64 \cdot 10^{-2}$	0,58	$-1,46 \cdot 10^{-2}$	$5,03 \cdot 10^{-11}$
X ₃ ²	0,26	0,56	8,33	$2,10 \cdot 10^{-6}$	0,40	$2,52 \cdot 10^{-9}$

X₁: Ratio (mL solvente/g de muestra); X₂: Concentración etanol (%); X₃: Tiempo (horas);

Tras realizar el análisis de regresión, se puede destacar que para ninguno de los tres modelos fue estadísticamente significativa la variable correspondiente a la concentración del solvente empleado en el momento de la extracción. En el caso del rendimiento, tampoco resultaron significativos los cuadrados de las variables X_1 y X_3 . Por otro lado, en los compuestos fenólicos ni el cuadrado de la concentración de etanol ni la interacción de esta con el tiempo (X_2^2 y $X_2 X_3$) resultaron significativas para el modelo. Al igual que en el caso de la optimización de *T. mastichina* el factor significativo que mayor influencia provoca sobre los tres modelos es el tiempo (X_3), en el caso del rendimiento se observa una influencia positiva, mientras que en el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante tiene un efecto negativo. En el caso del rendimiento la ratio (X_1) es la segunda variable que mayor influencia tiene, a diferencia del resto de modelos donde es el cuadrado del tiempo (X_3^2).

Los factores que no fueron estadísticamente significativos ($p > 0,05$) se eliminaron de cada respuesta mediante el procedimiento de regresión de eliminación hacia atrás. Estas ecuaciones (Ecuación 12, 13 y 14) permiten estimar las variables dependientes para cualquier valor de las condiciones de extracción dentro de los rangos estudiados.

$$Y_1 = -12,9 + 0,59 X_1 + 12,58 X_3 - 4 \cdot 10^{-3} X_1 X_2 - 0,17 X_1 X_3 + 3,08 \cdot 10^{-3} X_2^2 - 9,18 \cdot 10^{-2} X_2 X_3$$

(Ec. 12)

$$Y_2 = 194,27 - 2,49 X_1 - 58,34 X_3 + 1,80 \cdot 10^{-2} X_1^2 - 9,23 \cdot 10^{-3} X_1 X_2 + 0,55 X_1 X_3 + 8,33 X_3^2$$

(Ec. 13)

$$Y_3 = 6,92 - 0,20 X_1 - 0,81 X_3 + 2,04 \cdot 10^{-3} X_1^2 - 2,03 \cdot 10^{-4} X_1 X_2 + 4,27 \cdot 10^{-3} X_1 X_3 + 2,81 \cdot 10^{-4} X_2^2 - 1,46 \cdot 10^{-2} X_2 X_3 + 0,40 X_3^2$$

(Ec.14)

donde Y_1 , Y_2 e Y_3 , representan el rendimiento, el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante de la especie *J. communis*, respectivamente. Los términos $X_1 X_2$ y X_3 , hacen referencia a la ratio muestra y solvente, la concentración de solvente empleada y la duración del proceso de extracción.

Ninguna de las respuestas estudiadas (Tabla 5.11) resultaron ser no significativas según el test ANOVA, y todas mostraron un comportamiento en sus ecuaciones polinomiales (Ec. 12, 13 y 14) de carácter cuadrático.

Tabla 5.11. Parámetros estadísticos de los modelos de optimización del rendimiento, contenido en fenoles totales y capacidad antioxidante de *J. communis*.

Parámetros estadísticos	Rendimiento	Fenoles totales	Capacidad antioxidante
R ²	0,949	0,902	0,941
R ² ajustado	0,936	0,889	0,931
Error estándar	1,124	5,309	0,193
Coefficiente de variación	7,841	8,325	9,968
Nivel de significancia	0,00564	7,0335·10 ⁻¹¹	3,842·10 ⁻¹⁴

A diferencia de los modelos obtenidos de las anteriores especies, en el caso del *J. communis* se obtuvieron unos valores de R² y R² ajustado más elevados y próximos a uno que en el resto de especies. De igual manera se puede observar una mayor cercanía en torno a la línea de equivalencia entre los datos experimentales y los estimados por el modelo que lo obtenido en el caso de *S. rosmarinus* y *T. mastichina*, especialmente en el caso del rendimiento (Figura 5.9 A, C y E). Sin embargo, todavía se muestra heterogeneidad en los resultados según sus residuos los cuales muestran lejanía en torno a la línea de equivalencia (Figura 5.9 B, D y F). Los valores bajos en los tres modelos presentaron una menor desviación respecto a la línea de tendencia que el resto de valores.

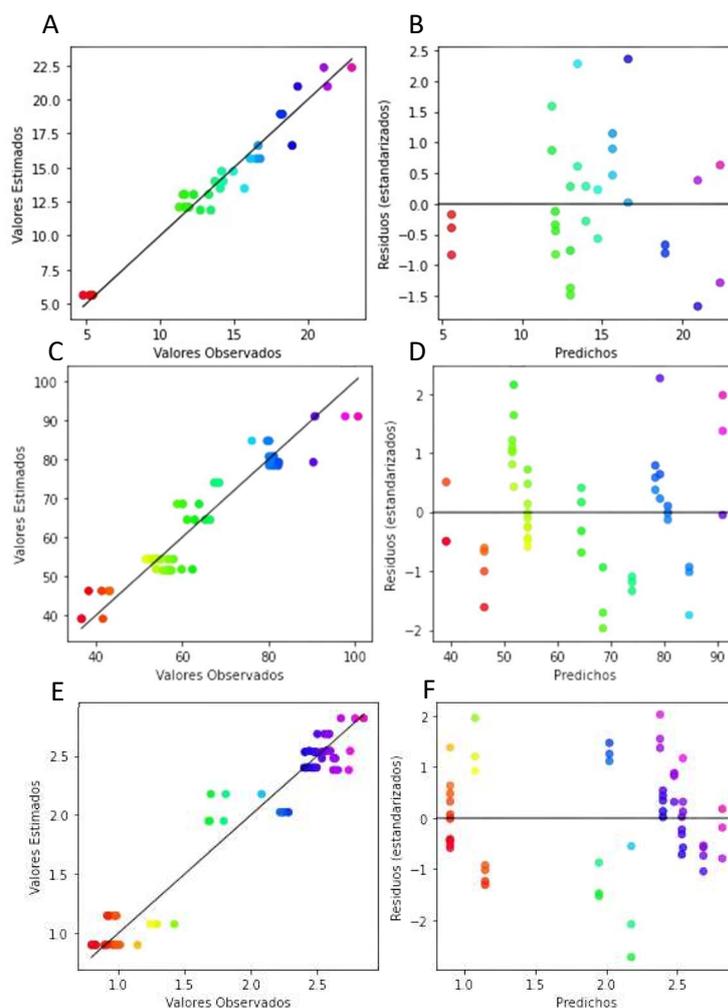


Figura 5.9 Correlación entre los valores estimados y experimentales para el modelo de optimización del rendimiento (%) (A, B), el contenido de fenoles totales (mg GAE/g extracto liofilizado) (C, D) y capacidad antioxidante (mmol Trolox/g extracto liofilizado) (E, F) de *J. communis*.

Las gráficas de superficie de respuesta obtenidas con el fin de describir el comportamiento del rendimiento de la extracción frente a las variables de interés se recogen en la figura 5.10. Paradójicamente, se observó un mayor rendimiento conforme las condiciones de la extracción se aproximan a los rangos inferiores y superiores planteados, para las tres variables. En especial, el rendimiento fue máximo cuanto superior fue la concentración de solvente empleado y menor el tiempo del proceso de extracción. La ratio de solvente empleada respecto a la muestra presentó una dualidad de comportamiento, cuanto menor fue este valor y mayor la concentración del solvente, mayor fue el rendimiento obtenido, sin embargo, el rendimiento también resultó máximo cuanto mayor fue el volumen de solvente empleado por gramo de muestra en periodos de extracción cortos. Parzhanova et al.,

(2018) estudiaron el efecto de la concentración del solvente empleado en diferentes parámetros de la extracción del enebro, concluyendo que a mayores concentraciones de etanol se observaba una tendencia a aumentar el rendimiento obtenido en el proceso de extracción. Elmastaş et al. (2006) también obtuvieron un mayor rendimiento empleando etanol puro que empleando agua.

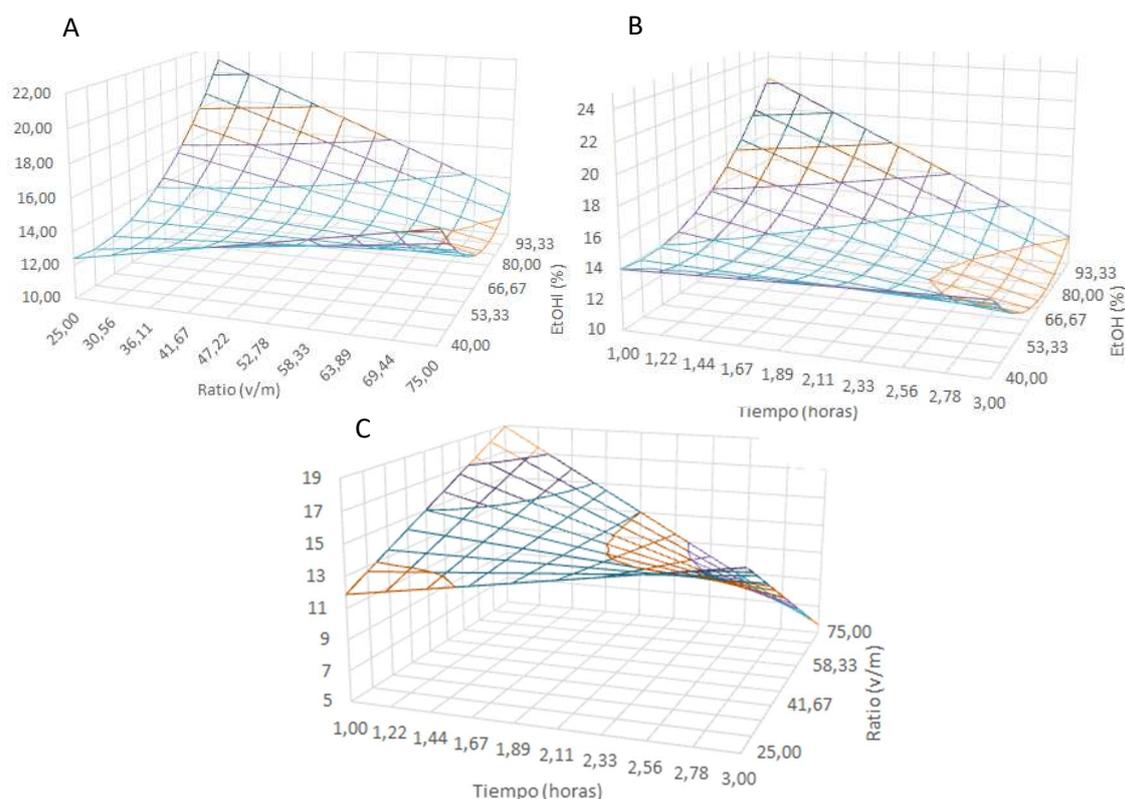


Figura 5.10. Gráficas de superficie 3D elaboradas a partir del modelo de extracción Soxhlet para la optimización del rendimiento (%) de la especie *J. communis*. Interacción entre la ratio de muestra y solvente y la concentración de solvente a las 2 h de extracción (A); entre el tiempo y la concentración de solvente con una ratio de 50 mL de solvente por gramo de muestra seca (B); y entre el tiempo y la ratio de muestra y solvente al 70% de etanol (C).

En la figura 5.11 se muestra el efecto de los factores sobre la eficiencia de la extracción de compuestos fenólicos totales. Cabe destacar que unas condiciones cercanas a las intermedias establecidas para el caso del volumen solvente empleado y de la duración de esta etapa, provocaron una disminución notable en la obtención de esta categoría de compuestos. Por otra parte, la concentración de solvente empleada minimizó el contenido de fenoles conforme mayor es el contenido de etanol. El estudio de Elboughdiri et al. (2020) obtuvieron efectos que difieren de lo obtenido experimentalmente, alcanzando la máxima extracción de compuestos fenólicos conforme superior fue la concentración de etanol como solvente. Por otro lado,

Elmastaş et al. (2006) determinaron un mayor contenido de compuestos fenólicos en extractos con agua como solvente que con etanol puro.

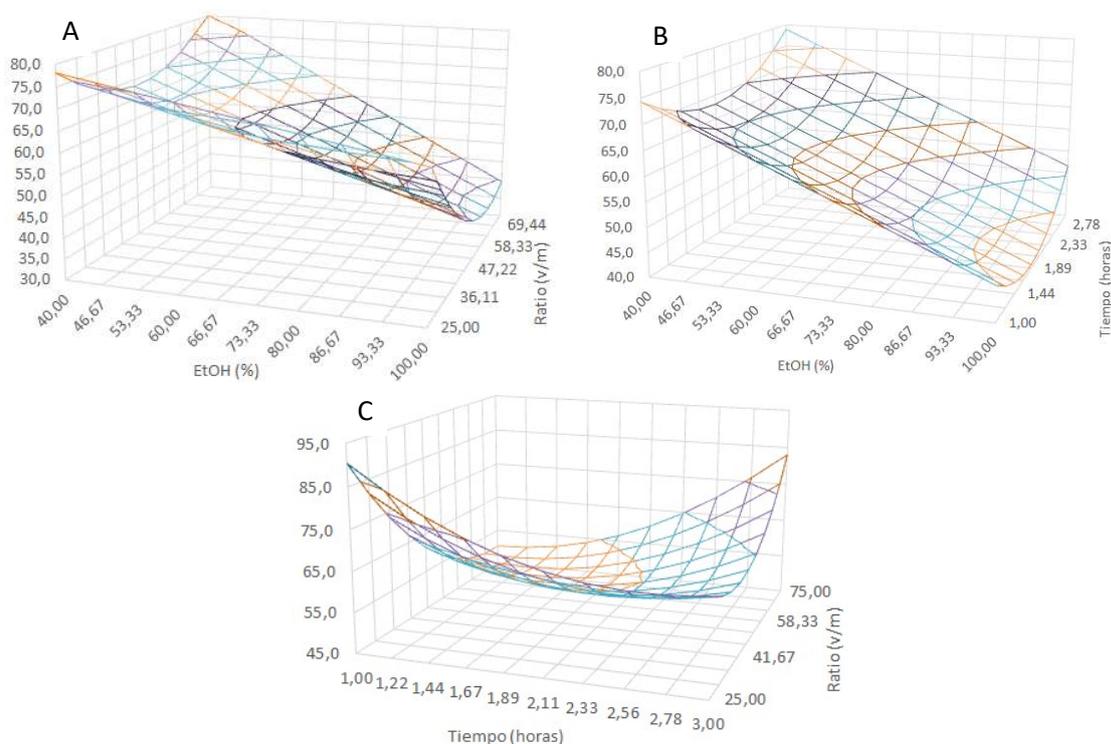


Figura 5.11. Gráficas de superficie 3D elaboradas a partir del modelo de extracción Soxhlet para la optimización de la cantidad de fenoles totales (mg GAE/g extracto liofilizado) de la especie *J. communis*. Interacción entre la ratio de muestra y solvente y la concentración de solvente a las 2 h de extracción (A); entre el tiempo y la concentración de solvente con una ratio de 50 mL de solvente por gramo de muestra seca (B); y entre el tiempo y la ratio de muestra y solvente al 70% de etanol (C).

Por último, en la extracción de compuestos con actividad antioxidante frente al radical DPPH (Figura 5.12), la ratio de solvente y muestra se comportó de forma similar al tiempo y con la concentración de solvente. La ratio empleada en la extracción ejerce una mayor influencia sobre el resto de variables independientes y se obtiene la menor capacidad antioxidante con volúmenes cercanos a 50 mL/g de muestra. Por otro lado, el tiempo y la concentración de etanol interaccionan de forma que tanto a concentraciones altas y cortos ciclos de extracción como a concentraciones bajas de etanol y tiempos prolongados, se maximiza la capacidad antioxidante de esta especie. Parzhanova et al., (2018) obtuvieron una mayor actividad antioxidante frente al radical DPPH en extractos con solventes con una concentración de 70% de etanol frente a 50% y agua. En el caso del presente estudio, sucedería de forma similar en extracciones de corta duración mientras que en prolongadas, sucedería la situación inversa.

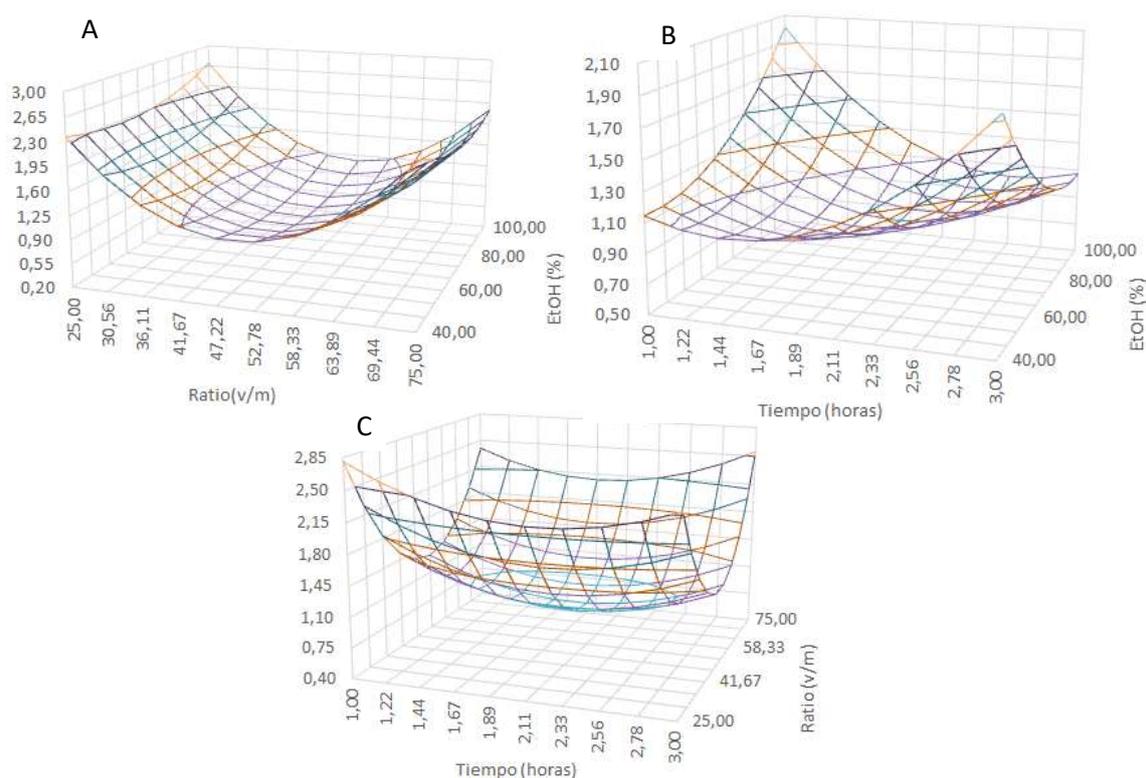


Figura 5.12. Gráficas de superficie 3D elaboradas a partir del modelo de extracción Soxhlet para la optimización de la capacidad antioxidante (mmol Trolox/g extracto liofilizado) de la especie *J. communis*. Interacción entre la ratio de muestra y solvente y la concentración de solvente a las 2 h de extracción (A); entre el tiempo y la concentración de solvente con una ratio de 50 mL de solvente por gramo de muestra seca (B); y entre el tiempo y la ratio de muestra y solvente al 70% de etanol (C).

En primer lugar se determinaron los valores máximos atribuibles a cada variable según la maximización por separado de cada modelo, los cuales resultaron ser: 22,87%, 97,89 mg GAE/g y 3,38 mmol Trolox/g extracto liofilizado, para el rendimiento, contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante, respectivamente. Posteriormente, se hallaron las condiciones óptimas de las tres variables dependientes optimizando las tres respuestas evaluadas (tabla 5.12). Los valores máximos alcanzables para la optimización del conjunto de las tres respuestas resultaron cercanos al máximo posible en el caso de la capacidad antioxidante, aunque no tan próximos en el caso del resto de respuestas. A partir de estos valores y conociendo los polinomios que las modelizan se obtuvieron sus valores estimados. De forma experimental se aplicaron las condiciones óptimas y se determinaron los nuevos resultados.

Tabla 5.12. Parámetros estadísticos de los modelos de optimización del rendimiento, contenido en fenoles totales y capacidad antioxidante de *J. communis*. Intervalo de confianza de $\alpha=0,05$, $n=3$ (Y1) y $n=6$ (Y2 e Y3).

Ensayo	Variables independientes			Variables dependientes		
	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	Y ₂	Y ₃
Modelado	25	91	1	18,26	86,13	3,36
Experimental	25	91	1	18,32 ± 0,61	83,41 ± 11,13	3,31 ± 0,40

X₁: Ratio (mL solvente/g de muestra); X₂: Concentración etanol (%); X₃: Tiempo (h); Y₁: Rendimiento (%); Y₂: Contenido en fenoles totales (mg GAE/g extracto liofilizado); Y₃: Capacidad antioxidante (mmol Trolox/g extracto liofilizado)

Del mismo modo que en las especies anteriores, el rendimiento, contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante determinados a partir de las ecuaciones de los modelos se corresponden con los obtenidos experimentalmente, al encontrarse dentro de su intervalo de confianza. La implantación de las condiciones establecidas como óptimas permite maximizar las tres respuestas estudiadas.

En el caso del enebro se obtuvo un menor rendimiento y contenido en compuestos fenólicos que en el romero y tomillo blanco, 37% y 100,98 mg GAE/g extracto liofilizado y 26,04% y 150,36 mg GAE/g extracto liofilizado, respectivamente. Sin embargo, la capacidad antioxidante obtenida fue superior al resto de especies, 1,37 y 1,88 mmol Trolox/g extracto liofilizado, para *S. rosmarinus* y *T. mastichina* respectivamente.

Con el objetivo de extrapolar los resultados obtenidos para las tres especies a escala industrial, serían necesarios estudios más exhaustivos que trataran de minimizar los tiempos de tratamiento sin reducir el rendimiento, contenido de fenoles y capacidad antioxidante. Además, de reducir los tiempos de duración, otros factores de interés económico como un menor uso de materia vegetal o de solventes de difícil gestión, se deberían tener en cuenta para evaluar las mejores condiciones para su extracción a escala industrial.

5.2. EVALUACIÓN IN VITRO DE LA CAPACIDAD ANTIFÚNGICA

Los valores de actividad mínima inhibitoria (CMI) y fungicida (CMF) de los extractos de *S. rosmarinus*, *T. mastichina* y *J. communis* (mg/mL) frente a los hongos estudiados, se recogen en la Tabla 5.13. En las CMF estudiadas se determinaron recuentos de colonias fúngicas por debajo de la concentración inoculada, alcanzándose en todos los casos un 99,9% de inhibición del crecimiento respecto la

carga inicial. Únicamente, se determinó esta concentración en aquellas especies en las que se observaba inhibición.

Tabla 5.13. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y fungicida (CMF) de extractos hidroetanólicos (mg/mL) determinados por el método de microdilución.

Especie	<i>S. rosmarinus</i>		<i>T. mastichina</i>		<i>J. communis</i>	
	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF
<i>M. fructicola</i>	>100	>100	50-100	100	>100	>100
<i>A. alternata</i>	>100	>100	50-100	100	>100	>100
<i>P. expansum</i>	>100	>100	50-100	100	>100	>100
<i>P. italicum</i>	50-100	100	50-100	100	>100	>100
<i>R. stolonifer</i>	50-100	100	12,5-25	25	>100	>100
<i>Cladosporium</i> sp.	25-50	50	50-100	100	>100	>100
<i>G. candidum</i>	>100	>100	50-100	100	>100	>100
<i>B. cinerea</i>	>100	>100	50-100	100	>100	>100

Los resultados presentados son representativos de tres réplicas independientes. Un >CMI o CMF implica una concentración superior a la máxima estudiada.

El extracto que mostró una mayor capacidad antifúngica a menores concentraciones fue *T. mastichina*, salvo en el caso de *Cladosporium* sp. donde *S. rosmarinus* inhibió el crecimiento a menores concentraciones. El tomillo blanco es una de las especies de *Thymus* spp. que se caracteriza por su actividad antimicrobiana y antioxidante (Salehi et al., 2019). El contenido de compuestos fenólicos se encuentra estrechamente relacionado con la capacidad antifúngica de los extractos, en el caso de *T. mastichina* fue aquel con mayor concentración media, de 150,36 mg GAE/g extracto liofilizado, por encima de lo obtenido en el romero y enebro, 100,98 y 83,41 mg GAE/g extracto liofilizado, respectivamente (Chen et al., 2019).

La concentración mínima fungicida del tomillo blanco fue de 100 mg/mL para la mayoría de los hongos fitopatógenos estudiados: *M. fructicola*, *A. alternata*, *P. expansum*, *P. italicum*, *Cladosporium* sp., *G. candidum* y *B. cinérea*. Esta fue menor en el caso de *R. stolonifer*, en la que se determinó actividad antifúngica a una concentración de 25 mg/mL. La CMI y CMF apreciadas por el tomillo blanco para *M. fructicola* fueron superiores a la de extractos de otras especies como *Stellera chamaejasme*, en la que se observó a concentraciones de 250 y 2000 µg/mL, respectivamente (Capuzzo, Maffei y Occhipinti, 2013). La concentración inhibitoria por parte de *T. mastichina* para la mayoría de los hongos estudiados se observó entre 50 y 100 mg/mL.

El romero no mostró inhibición a ninguna de las concentraciones estudiadas en las especies: *M. fructicola*, *A. alternata*, *P. expansum*, *G. candidum* y *B. cinérea*. Blank, Alves, Nascente, Freitag y Cleff (2020) determinaron que la concentración mínima inhibitoria y antifúngica de extracto etanólico de romero para el género *Geotrichum* es de 2,34 mg/mL y 3,65 mg/mL, respectivamente, a diferencia del presente estudio donde se obtuvo un valor superior a 100 mg/mL para ambos casos. En el caso de *P. expansum* los valores de CMI determinados también fueron superiores a los hallados para extractos etanólicos de romero en otros estudios como el de Outaleb et al. (2015), el cual se encontraba entre 6-8 µg/mL. Para hongos como *P. italicum* y *R. stolonifer*, se observó susceptibilidad al extracto hidroetanólico de romero a concentraciones entre 50 y 100 mg/mL, siendo esta última la que conseguía una inhibición del 99,9% de ambas especies fúngicas. La mayor efectividad de este extracto se determinó para *Cladosporium* sp. donde una concentración de 50 mg/mL era suficiente para mostrar actividad antifúngica. Las CMI detectadas en el romero y el tomillo blanco para *P. italicum* son superiores a lo observado en extractos de *Inula viscosa*, *Trigonella foenum-graecum* y *Solanum nigrum*, que fueron en los tres casos de 130 µg/mL (Kanan y Al-Najar, 2009). Giner et al. (2011) determinaron que una concentración de 51,2 mg/mL de la mezcla de los extractos de las especies *S. rosmarinus* y *T. mastichina* no era suficiente para inhibir el crecimiento de hongos filamentosos como *P. digitatum* y *A. niger*. Para ambos extractos se determinó que la CMI se encontraba entre los 50 y 100 mg/mL para el caso de *P. italicum*, siendo 100mg/mL su CMF.

El enebro fue el extracto con menor actividad antifúngica debido a que en ninguna de las concentraciones empleadas produjo efecto sobre las especies fúngicas. Sin embargo, la CMI del extracto hidroetanólico del enebro para otras especies del género *Alternaria* como *A. solani* (Belov et al., 2023) fue de 1,25 mg/mL, lo que resulta inferior a la concentración estudiada.

Además de afectar el crecimiento micelar, los extractos de romero y tomillo blanco evitaron que *M. fructicola* formase esporas a concentraciones superiores a 6,25 mg/mL. Esta concentración fue inferior en los tres extractos para *R. stolonifer* en el que únicamente con 0,391 mg/mL se inhibió su esporulación. Estos valores son inferiores a lo obtenido para extractos de *Asteriscus graveolens*, *Bubonium odorum* y *Halimium umbellatum* las cuales inhibieron la formación de esporas en *P. italicum* y *P. digitatum* a concentraciones de 10 mg/mL.

6. CONCLUSIONES

Primera

La metodología de superficie respuesta resulta de utilidad para describir la influencia de la composición del solvente, de su ratio respecto a la muestra empleada, y del tiempo de extracción, en el rendimiento, el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante que exhiben extractos de las especies *T. mastichina*, *S. rosmarinus* y *J. communis*.

Segunda

La modelización mediante la metodología de superficie respuesta de la extracción de compuestos bioactivos de las especies *S. rosmarinus* y *T. mastichina* mediante el sistema Soxhlet indica que las condiciones que maximizan el rendimiento del proceso, el contenido en compuestos fenólicos totales y su capacidad de inhibir el radical libre DPPH son similares, encontrándose entre 51 y 54 mL solvente/g de muestra y una concentración de etanol del 69 y 61% durante 2,5 y 3 horas, respectivamente.

Tercera

Según las regresiones obtenidas por la metodología de superficie respuesta, las condiciones óptimas de extracción que maximizan el rendimiento, el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante de extractos hidroetanólicos de la especie *J. communis* obtenidos mediante Soxhlet son 25 mL solvente/g de muestra y usando etanol en una concentración del 91% durante 1 hora de tratamiento.

Cuarta

Los modelos que explican la influencia de la ratio de solvente y muestra, la concentración de solvente y el tiempo de extracción sobre el rendimiento, el contenido en compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de los extractos de *S. rosmarinus*, *T. mastichina* y *J. communis* presentan deficiencias en el ajuste de los datos experimentales. Sin embargo, la validación a partir de las condiciones óptimas de las tres especies reproduce los valores teóricos calculados por los modelos, indicando la aptitud de las regresiones para predecir los resultados obtenidos experimentalmente.

Quinta

Los extractos hidroetanólicos de *S. rosmarinus* y *T. mastichina*, son efectivos en la inhibición del crecimiento *in vitro* de tres de los principales mohos causantes de fitopatologías en productos hortofrutícolas (*Penicillium italicum*, *Rhizopus stolonifer* y *Cladosporium* sp.).

Sexta

El extracto de *T. mastichina* obtenido en condiciones de extracción óptimas tiene capacidad fungistática y fungicida *in vitro* frente a ocho cepas de mohos fitopatógenos, destacando su capacidad de inhibir el crecimiento de *Rhizopus stolonifer* a una concentración de 25 mg/mL.

Séptima

Continuar los estudios sobre la capacidad de los extractos de *S. rosmarinus* y *T. mastichina* de modificar la esporulación de los mohos estudiados a concentraciones inferiores a las fungistáticas resulta de interés para comprender los mecanismos de acción de estos extractos vegetales sobre la inhibición de especies fúngicas y para explorar nuevas vías de aplicación en el ámbito agroalimentario.

Octava

Las propiedades de los extractos de *T. mastichina* pueden resultar una oportunidad para emplear esta especie como una fuente alternativa de compuestos con potencial antifúngico, aunque se requieren más análisis y estudios para fundamentar estos hallazgos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adama (2021). *Fungastop Dust*. Recuperado de: <https://www.adama.com/chile/es/productos/fungicidas/fungastopdust>
- Agrisolver (2019). *Ficha técnica TRILOGY Summit Agro*. Recuperado de: <https://www.agrisolver.com/productos-para-control/trilogy?tabIndex=1>
- Albano, S. M. y Miguel, M. G. (2011) Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. *Industrial Crops and Products* 33, pp. 338-343. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.11.012>
- Aqel, U., Aftab, T., Khan, M. M. A. y Naeem, M. (2023). Regulation of essential oil in aromatic plants under changing environment. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 32. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2022.100441>
- Asensio-Vegas, C., Ben Khedim, M., Rico, D., Brunton, N., Rai, D. , Hossain, M. y Martin-Diana, A. B. (2018). In-vitro Approach for the Determination of Antioxidant and Anti-inflammatory Activity of Wild Marjoram (*Thymus mastichina* L.). *Journal of Food and Nutrition Research* 6 (12), pp. 731-739. Recuperado de: <https://doi.org/10.12691/jfnr-6-12-3>
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., e Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils, A review. *Food and Chemical Toxicology* 46, pp. 446-475. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Barros, L., Heleno, S. A., Carvalho, A. M., y Ferreira, I. C. F. R. (2010). Lamiaceae often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: Vitamins and phenolics. *Food Science and Technology* 43, pp. 544-550. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.09.024>
- Basas-Jaumandreu, J., López, J. F. y de las Heras, F.X.C. (2015). Labdane-type diterpenoids from *Juniperus communis* needles. *Industrial Crops and Products* 76 (15), pp. 333-345. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.005>
- Baydar, H., özkan, G., Erbas, S. y Altindal, D. (2009) Yield, Chemical Composition and Antioxidant Properties of Extracts and Essential Oils of Sage and Rosemary Depending on Seasonal Variations. *Acta Horticulturae* 826, pp. 383-390. Recuperado de: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.826.54>

Belov, T., Terenzhev, D., Bushmeleva, K.N., Davydova, L., Burkin, K., Fitsev, I., Gatiyatullina, A., et al. (2023) Comparative Analysis of Chemical Profile and Biological Activity of *Juniperus communis* L. Berry Extracts. *Plants* 12 (19). Recuperado de: <https://doi.org/10.3390/plants12193401>

Bhavaniramy, S., Vishnupriya, S., Al-Aboody, M. S., Vijayakumar, R., y Baskaran, D. (2019). Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. *Grain & Oil Science and Technology* 2 (2), pp. 49-55. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gaost.2019.03.001>.

Bitwell, C., Indra, S. S., Luke, C. y Kakoma, M. K. (2023). A review of modern and conventional extraction techniques and their applications for extracting phytochemicals from plants. *Scientific African* 19. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2023.e01585>.

Blank, D.E., Alves, G.H., Nascente, P. Da S., Freitag, R.A. y Cleff, M.B. (2020) Bioactive Compounds and Antifungal Activities of Extracts of Lamiaceae Species. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment* 9 (3), pp. 85-96. Recuperado de: <https://doi.org/10.4236/jacen.2020.93008>

Bolouri, P., Salami, R., Kouhi, S., Kordi, M., Asgari Lajayer, B., Hadian, J. y Astatkie, T. (2022) Applications of Essential Oils and Plant Extracts in Different Industries. *Molecules* 27 (24). Recuperado de: <https://doi.org/10.3390/molecules27248999>

Boncompte Ribera, T. y Minguet Pla, J.S. (2006). *Dossier Tècnic, formació i asesament al sector agroalimentari nº13: Plantas aromáticas y medicinales*. Generalitat de Catalunya.

Box, G.E.P y Wilson, K.B. (1951). On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)* 13 (1).

Box, G.E.P. y Behnken, D.W. (1960). Three level design for the study of quantitative variables. *Technometrics* 2 (4), pp. 455–475.

Capuzzo, A., Maffei, M. E. y Occhipinti, A. (2013) Supercritical Fluid Extraction of Plant Flavors and Fragrances. *Molecules* 18 (6), pp. 7194-7238. Recuperado de: <https://doi.org/10.3390/molecules18067194>

Carpentieri, S., Režek Jambrak, A., Ferrari, G., y Pataro, G. (2022). Pulsed Electric Field-Assisted Extraction of Aroma and Bioactive Compounds From Aromatic Plants

and Food By-Products. *Frontiers in Nutrition* 8. Recuperado de: <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.792203>

Chen, J., Shen, Y., Chen, C. y Wan, C. (2019) Inhibition of Key Citrus Postharvest Fungal Strains by Plant Extracts In Vitro and In Vivo: A Review. *Plants (Basel)* 8 (2). Recuperado de: <https://doi.org/10.3390/plants8020026>.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute (2008). *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi, approved standard*. Documento M38-A (2ª ed.) 22 (16), Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, Estados Unidos.

Arsad, A., Danlami, J. M., Zaini, M. A. A. y Sulaiman, H. (2014). A comparative study of various oil extraction techniques from plants. *Reviews in Chemical Engineering* 30 (6), pp. 605-626. Recuperado de: <https://doi.org/10.1515/revce-2013-0038>

Deresa y Diriba (2023). Phytochemicals as alternative fungicides for controlling plant diseases: A comprehensive review of their efficacy, commercial representatives, advantages, challenges for adoption, and possible solutions. *Heliyon* 9 (3). Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13810>

Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N. y Mnif, W. (2016). Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines* 3 (25). Recuperado de: <https://doi.org/10.3390/medicines3040025>

Dhouibi, N., Manuguerra, S., Arena, R., Messina, C.M., Santulli, A., Kacem, S., Dhaouadi, H., et al. (2023) Impact of the Extraction Method on the Chemical Composition and Antioxidant Potency of *Rosmarinus officinalis* L. Extracts. *Metabolites* 13 (290). Recuperado de: <https://doi.org/10.3390/metabo13020290>

Elboughdiri, N., Ghernaout, D., Kriaa, K. y Jamoussi, B. (2020) Enhancing the Extraction of Phenolic Compounds from Juniper Berries Using the Box-Behnken Design. *ACS Omega* 5, pp. 27990-28000. Recuperado de: <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c03396>

Elmastaş, M., Gülçin, I., Beydemir, Ş., Küfrevioğlu, Ö. İ. y Aboul-Enein, H. Y. (2006) A Study on the In Vitro Antioxidant Activity of Juniper (*Juniperus communis* L.) Fruit Extracts. *Analytical Letters* 39, pp. 47-65. Recuperado de: <https://doi.org/10.1080/00032710500423385>

Espinel-Ingroff, A. y Cantón, E. (2007) *Chapter 10, Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi*. Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols. Taylor y Francis Group.

Fejér, J., Kron, I., Grul'ová, D. y Eliašová, A. (2020) Seasonal Variability of *Juniperus communis* L. Berry Ethanol Extracts: 1. In Vitro Hydroxyl Radical Scavenging Activity. *Molecules* 25. Recuperado de: <https://doi.org/10.3390/molecules25184114>

Fernández-San Millán, A., Larraya, L., Farran, I., Ancín, M. y Veramendi, J. (2021). Successful biocontrol of major postharvest and soil-borne plant pathogenic fungi by antagonistic yeasts. *Biological Control* 160. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104683>

Fongang Fotsing, Y.S., Bankeu Kezetas, J. J., Gaber El-Saber, B., Iftikhar, A. y Lenta Ndjakou, B. (2022). Extraction of Bioactive Compounds from Medicinal Plants and Herbs. H. A. El-Shemy (Ed.), *Natural Medicinal Plants* (IntechOpen). Recuperado de: <https://doi.org/10.5772/intechopen.98602>

Fragkouli, R., Antonopoulou, M., Asimakis, E., Spyrou, A., Kosma, C., Zotos, A., Tsiamis, G., et al. (2023). Mediterranean Plants as Potential Source of Biopesticides: An Overview of Current Research and Future Trends. *Metabolites* 13 (9). Recuperado de: <https://doi.org/10.3390/metabo13090967>

Giannenas, I., Sidropoulou, E., Bonos, E., Christaki, E. y Florou-Paneri, P. (2021). Feed Additives: Chapter 1- The history of herbs, medicinal and aromatic plants, and their extracts: Past, current situation and future perspectives. *Academic Press*, pp. 1-18. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814700-9.00001-7>.

Giner, M., Vegara, S., Funes, L., Martí, N., Saura, D., Micol, V. y Valero, M. (2011) Antimicrobial activity of food-compatible plant extracts and chitosan against naturally occurring micro-organisms in tomato juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92 (9), pp. 1917-1923 Recuperado de: <https://doi.org/10.1002/jsfa.5561>

Hosseini, H., Bolourian, S., Hamgini, E. Y. y Mahababadi, E. G. (2018) Optimization of heat- and ultrasound-assisted extraction of polyphenols from dried rosemary leaves using response surface methodology. *Journal of Food Processing and Preservation* 42 (11). Recuperado de: <https://doi.org/10.1111/jfpp.13778>

Jaime Gato, M. J. (2021). Revisión bibliográfica sobre nuevas técnicas de obtención de extractos a partir de sustratos vegetales. Trabajo de Fin de Grado. Universidad de Extremadura.

Jordán, M. J., Lax, V., Rota, M. C., Lorán, S. y Sotomayor, J. A. (2013) Effect of the phenological stage on the chemical composition, and antimicrobial and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L essential oil and its polyphenolic extract. *Industrial Crops and Products* 48, pp. 144-152. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.031>

Kanan, G. J. M. y Al-Najar, R. A. K. (2009) In vitro and in vivo activity of selected plant crude extracts and fractions against *penicillium italicum*. *Journal of Plant Protection Research* 49 (4). Recuperado de: <https://doi.org/10.2478/v10045-009-0054-9>

Khadduri, N. (2011). Using Essential Oils to Control Moss and Liverwort in Containers. *USDA Forest Service Proceedings RMRS-P-65*.

Kontogianni, V. G., Tomic, G., Nikolic, I., Nerantzaki, A. A., Sayyad, N., Stosic-Grujicic, S., Stojanovic, I., et al. (2012) Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. *Food Chemistry* 136 (1), pp. 120-129. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.091>

Kostyukovsky, M., Rafaeli, A., Gileadi, C., Demchenko, N., y Shaaya, E. (2002). Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: possible mode of action against insect pests. *Pest Management Science* 58 (11), pp. 1101-1106. Recuperado de: <https://doi.org/10.1002/ps.548>

Kumari, M. y Gupta, S.K. (2019). Response surface methodological (RSM) approach for optimizing the removal of trihalomethanes (THMs) and its precursor's by surfactant modified magnetic nanoadsorbents (sMNP) - An endeavor to diminish probable cancer risk. *Scientific Reports* 9. Recuperado de: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54902-8>

Lasdon, L. S., Fox, R. L., Ratner, M. W. (1974) Nonlinear optimization using the generalized reduced gradient method. *Revue française d'automatique, informatique, recherche opérationnelle* 8 (3), pp. 73-103. Recuperado de: http://www.numdam.org/item/RO_1974__8_3_73_0/

Librán, C. M., Moro, A., Zalacain, A., Molina, A., Carmona, M. y Berruga, M. I. (2013). Potential application of aromatic plant extracts to prevent cheese blowing. *World J Microbiol Biotechnol* 29, pp. 1179-1188. Recuperado de: <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1280-x>

Llorach, R., Tomás-Barberán, F. A. y Ferreres, F. (2004). Lettuce and chicory byproducts as a source of antioxidant phenolic extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (16), pp. 5109-5116. Recuperado de: <https://doi.org/10.1021/jf040055a>.

Lopes, T. A. M., Godoy, A. C., Sinosaki, N. B. M., Santos, P. D. S., Chiavelli, L. U. R., Silveira, R., Figueiredo, B. H. et al., (2020) Green Extraction Optimization of Bioactive Compounds from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Using Response Surface Methodology. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 31 (12), pp. 2603-2610. Recuperado de: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20200142>

López-Bascón, M. A. y Luque de Castro, M. D. (2020). *Liquid-Phase Extraction, chapter 11: Soxhlet Extraction*. Elsevier pp. 327-341. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816911-7.00011-6>

Mahallati, M.N. (2020). *Saffron: Science, Technology and Health: Advances in modeling saffron growth development at different scales*. Woodhead Publishing, pp. 139-167. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818638-1.00009-5>

MAPA, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2021a). *Anuario de Estadística 2021*. Recuperado de: <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadistica-digital/powerbi-cultivos.aspx>

MAPA, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2021b). *Encuesta de Comercialización de Productos Fitosanitarios 2021*. Recuperado de: <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/estadisticas-medios-produccion/fitosanitarios.aspx>

MAPA, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2022). *Producción ecológica Estadísticas 2021*.

Maurya, A., Prasad, J., Das, S. y Dwivedy, A. K. (2021) Essential Oils and Their Application in Food Safety. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 5. Recuperado de: <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.653420>

Mojaddam, M. y Pullen, K. R. (2019) Optimization of a Centrifugal Compressor Using the Design of Experiment Technique. *Applied Sciences* 9 (2). Recuperado de: <https://doi.org/10.3390/app9020291>

Muñoz, F. (1993) *Plantas medicinales y aromáticas. Estudio, cultivo y procesado*. Ediciones Mundi-Prensa. (1ª ed.) Madrid.

Musolino, V., Macrì, R., Cardamone, A., Tucci, L., Serra, M., Lupia, C., Maurotti, S. et al. (2023) *Salvia rosmarinus* Spenn. (Lamiaceae) Hydroalcoholic Extract: Phytochemical Analysis, Antioxidant Activity and In Vitro Evaluation of Fatty Acid Accumulation. *Plants* 12 (18). Recuperado de: <https://doi.org/10.3390/plants12183306>

Mutlu-Ingok, A., Devecioglu, D., Dikmetas, D. N., Karbancioglu-Guler, F. y Capanoglu, E. (2020). Antibacterial, Antifungal, Antimycotoxigenic and Antioxidant Activities of Essential Oils: An Updated Review. *Molecules* 25 (20). Recuperado de: <https://doi.org/10.3390/molecules25204711>

Nabet, N., Gilbert-López, B., Madani, K., Herrero, M., Ibáñez, E. y Mendiola, J. A. (2019) Optimization of microwave-assisted extraction recovery of bioactive compounds from *Origanum glandulosum* and *Thymus fontanesii*. *Industrial Crops and Products* 129, pp. 395-404. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.032>

Nikkhah, M., Hashemi, M., Habibi Najafi, M. B. y Farhoosh, R. (2017). Synergistic effects of some essential oils against fungal spoilage on pear fruit. *International Journal of Food Microbiology* 257, pp. 285-294. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.021>

Oliveira, J. L., Ramos Campos, E. V. y Fernandes Fraceto, L. (2018). Recent developments and challenges for nano-scale formulation of botanical pesticides for use in sustainable agriculture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66 (34), pp. 8898-8913. Recuperado de: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03183>

Outaleb, T., Hazzit, M., Ferhat, Z., Baaliouamer, A., Yekkour, A., Zitouni, A. y Sabaou, N. (2015) Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Algerian *Rosmarinus officinalis* L. Extracts, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18 (3), pp. 654-665, Recuperado de: <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.960276>

Papoutsis, K., Mathioudakis, M.M., Hasperué, J.H. y Ziogas, V. (2019) Non-chemical treatments for preventing the postharvest fungal rotting of citrus caused by *Penicillium digitatum* (green mold) and *Penicillium italicum* (blue mold), *Trends in Food Science & Technology* 86, pp. 479-491. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.053>

Parzhanova, A. B., Petkova, N. T., Ivanov, I. G. y Ivanova, S. D. (2018) Evaluation of Biologically Active Substance and Antioxidant Potential of Medicinal Plants Extracts for Food and Cosmetic Purposes. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 10 (7), pp. 1804-1809.

Peng, Y., Li, S. L., Yan, J., Tang, Y., Cheng, J. P., Gao, A. J., Yao, X., Ruan, J. J. y Xu, B. L. (2021) Research Progress on Phytopathogenic Fungi and Their Role as Biocontrol Agents. *Frontiers in Microbiology* 12. Recuperado de: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.670135>

Peñalver, P. (2005). *Aromaterapia*. Lideravet S.L. (1ª ed.) Tarragona.

Rabizadeh, F., Mirian, M. S., Doosti, R., Kiani-Anbouhi, R. y Eftekhari, E. (2022). Phytochemical Classification of Medicinal Plants Used in the Treatment of Kidney Disease Based on Traditional Persian Medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2022. Recuperado de: <http://doi.org/10.1155/2022/8022599>

Redfern, J., Kinninmonth, M., Burdass, D. y Verran, J. (2014) Using Soxhlet Ethanol Extraction to Produce and Test Plant Material (Essential Oils) for Their Antimicrobial Properties. *Journal of microbiology & biology education*, pp. 45-46. Recuperado de: <https://doi.org/10.1128/jmbe.v15i1.656>

Roby, M. H. H., Sarhan, M. A., Selim, K. A. H. y Khalel, K. I. (2012) Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products* 43, pp. 827-831. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.08.029>

Rodríguez-Solana, R. R., Salgado, J. M., Domínguez, J. M. y Cortés-Diéguéz, 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 (1), pp. 61-71. Recuperado de: <https://doi.org/10.1002/pca.2537>

Sadgrove, N. J., Padilla-González, G. F. y Phumthum, M. (2022) Fundamental Chemistry of Essential Oils and Volatile Organic Compounds, Methods of Analysis and Authentication. *Plants* 11 (6). Recuperado de: <https://doi.org/10.3390/plants11060789>

Salehi, B., Abu-Darwish, M.S., Tarawneh, A.H., Cabral, C., Gadetskaya, A.V., Salgueiro, L., Hosseinabadi, T., et al. (2019) Thymus spp. plants - Food applications and phytopharmacy properties. *Trends in Food Science & Technology* 85, pp.287-306. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.01.020>.

Santra, H. K. y Banerjee, D. (2020) *Natural Bioactive Products in Sustainable Agriculture : Natural Products as Fungicide and Their Role in Crop Protection*. Singapur: Springer. Recuperado de: https://doi.org/10.1007/978-981-15-3024-1_9

Semerdjieva, I., Zheljzakov, V.D., Radoukova, T., Dincheva, I., Piperkova, N., Maneva, V., Astatkie, T. et al. (2021). Biological Activity of Essential Oils of Four Juniper Species and Their Potential as Biopesticides. *Molecules* 26 (21). Recuperado de: <https://doi.org/10.3390/molecules26216358>

Shijie, L. (2020). Bioprocess Engineering. *Design of experiment*, pp. 885-933. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-821012-3.00020-8>

Silva, B.N., Cadavez, V., Ferreira-Santos, P., Teixeira, J.A. y Gonzales-Barron, U. (2021) Extraction, Chemical Characterization, and Antioxidant Activity of Bioactive Plant Extracts. *Proceedings* 70 (62). Recuperado de: <https://doi.org/10.3390/foods2020-07739>

Singleton, V. and Rossi, J. (1965) Colorimetry of Total Phenolic Compounds with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16, pp. 144-158.

Sofi, M. A., Nanda, A., Sofi, M. A., Maduraiveeran, R., Nazir, S., Siddiqui, N., Nadeem, A., et al. (2022) Larvicidal activity of Artemisia absinthium extracts with special referenceto inhibition of detoxifying enzymes in larvae of Aedes aegypti L. *Science* 34 (3). Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.102248>

Stk bio-aq technologies (2018) *TIMOREX GOLD®: Un fungicida de base botánica de amplio espectro*. Recuperado de: <https://stk-aq.com/product/timorex-gold-2/?lang=es>

Taghouti, M., Martins-Gomes, C., Félix, L. M., Schäfer, J., Santos, J.A., Bunzel, M., Nunes, F.M. et al. (2019a) Polyphenol composition and biological activity of *Thymus citriodorus* and *Thymus vulgaris*: Comparison with endemic Iberian *Thymus* species. *Food Chemistry* 331. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127362>

Taghouti, M., Martins-Gomes, C., Schäfer, J., Santos, J.A., Bunzel, M., Nunes, F.M. et al. (2019b) Chemical Characterization and Bioactivity of Extracts from *Thymus mastichina*: A *Thymus* with a Distinct Salvianolic Acid Composition. *Antioxidants* 9 (34). Recuperado de: <https://doi.org/10.3390/antiox9010034>

Thielmann, J., Murany, P. y Kazman, P. (2019) Screening essential oils for their antimicrobial activities against the foodborne pathogenic bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Heliyon* 4 (6). Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01860>

Tripathi, P. y Dubey, N. K. (2003) Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Tecnology* 32 (3), pp. 235-45. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2003.11.005>

Tzima, K., Brunton, N. P., Lyng, J. G., Frontuto, D. y Rai, D. K. (2021) The effect of Pulsed Electric Field as a pre-treatment step in Ultrasound Assisted Extraction of phenolic compounds from fresh rosemary and thyme by-products. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 69. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102644>

Vergara-Salinas, J. R., Pérez-Jiménez, J., Torres, J.L, Agosin, E. y 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 (44), pp. 10920-10929. Recuperado de: <https://doi.org/10.1021/jf3027759>

Vicente Illera, G. (2012). Fraccionamiento y aplicaciones de extractos supercríticos de romero (*Rosmarinus Officinalis*). (Tesis Doctoral) Universidad Autónoma de Madrid.

Vieira, T.M.F.S., Shimano, M.Y.H., Lima, R.S. y de Camargo, A.C. (2019). Optimization of extraction of antioxidants from aromatic herbs and their synergistic effects in a lipid model system. *Journal of Food Bioactives* 7, pp. 63–72. Recuperado de: <https://doi.org/10.31665/JFB.2019.7200>

Yeddes, W., Majdi, H., Gadhoumi, H., Affes, T. G., Mohamed, S. N., Wannas, W. A. y Saidani-Tounsi, M. (2022) Optimizing Ethanol Extraction of Rosemary Leaves and Their Biological Evaluations. *Journal of Exploratory Research in Pharmacology* 7 (2), pp. 85-94. Recuperado de: <https://doi.org/10.14218/JERP.2022.00002>

Zekeya, N., Ibrahim, M., Mamiro, B., Ndossi, H., Kilonzo, M., Mkangara, M., Chacha, M., et al. (2022) Potential of natural phenolic antioxidant compounds from *Bersama abyssinica* (Meliathacea) for treatment of chronic diseases. *Saudi Journal of Biological Sciences* 29 (6). Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.03.023>

Zhang, Q.W., Lin, L.G. y Ye, W.C. (2018) Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine* 13 (20). Recuperado de: <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>

Zhang, R., Gu, X., Xu, G. y Fu, X. (2021). Improving the lipid extraction yield from *Chlorella* based on the controllable electroporation of cell membrane by pulsed electric field. *Bioresource Technology* 330. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124933>.

Zhu, Y., Li, C., Cui, H. y Lin, L. (2021) Encapsulation strategies to enhance the antibacterial properties of essential oils in food system. *Food Control* 123. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107856>