



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los alimentos

Caracterización fitoquímica de compuestos con capacidad antioxidante y antibacteriana en *Satureja intricata*

Phytochemical characterization of compounds with antioxidant and antibacterial capacity in *Satureja intricata*

Autor/es

Enrique Figuerola Marín

Director/es

Esther Asensio Casas

Facultad de Veterinaria

2021

ÍNDICE

Resumen.....	1
Abstract	2
1. Introducción	3
1.1. Interés por la búsqueda de antimicrobianos y antioxidantes naturales.....	3
1.2. Características de la <i>Satureja intricata</i>	4
1.3. Compuestos bioactivos	5
1.4. Uso de aceites esenciales en envases	6
2. Justificación y objetivos.....	7
3. Materiales y métodos	9
3.1. Material vegetal de <i>Satureja intricata</i>	9
3.2. Extracción del material vegetal.....	9
3.3. Obtención aceite esencial de <i>Satureja intricata</i>	10
3.4. Análisis del material vegetal mediante SPME-GC-MS.....	10
3.5. Análisis del material vegetal mediante HS-SPME-GC-MS	11
3.6. Ensayos de capacidad antioxidante	11
3.6.1. Capacidad antioxidante extractos metanólicos de <i>Satureja intricata</i>	11
3.6.2. Capacidad antioxidante aceite esencial de <i>Satureja intricata</i>	12
3.7. Ensayos de capacidad antimicrobiana	12
4. Resultados y discusión	15
4.1. Selección de las condiciones óptimas para la extracción del material vegetal de <i>S. intricata</i>	15
4.1.1. Selección de la cantidad de muestra a extraer	15
4.1.2. Selección del agente extractante	16
4.1.3. Selección de la fibra SPME para el análisis mediante SPME-GC-MS.....	17
4.2. Análisis del material vegetal de <i>Satureja intricata</i> mediante SPME-GC-MS.....	18
4.3. Análisis del material vegetal de <i>Satureja intricata</i> mediante HS-SPME-GC-MS	21
4.4. Cuantificación de terpenos presentes en muestras de <i>Satureja intricata</i>	25
4.5. Resultados de los ensayos de capacidad antioxidante	27
4.6. Resultados de los ensayos de capacidad antimicrobiana	29
5. Conclusiones.....	33
6. Valoración personal.....	36
7. Bibliografía	37

Resumen

En este Trabajo de Fin de Grado se ha optimizado la extracción del material vegetal de *Satureja intricata* para su análisis mediante microextracción en fase sólida acoplada a cromatografía de gases (SPME-GC-MS). Se han identificado y cuantificado compuestos terpenoides con propiedades antimicrobianas y/o antioxidantes. Los resultados obtenidos muestran diferencias en la composición química (terpenoides) del material vegetal en función de la época en la que han sido recogidas (septiembre o abril), así como entre las partes de la planta (hoja o flor). Se ha visto la necesidad de cuantificar los compuestos terpenoides, y no trabajar con el % de área obtenido en el cromatograma, para conocer realmente los compuestos que se encuentran en mayor concentración en los extractos metanólicos obtenidos de las tres muestras estudiadas.

Se han realizado ensayos de capacidad antioxidante (DPPH) con los extractos metanólicos del material vegetal sometido a estudio, así como del aceite esencial de *S. intricata*. Los resultados obtenidos muestran que los extractos metanólicos presentan baja/moderada capacidad antioxidante, mientras que el aceite esencial presenta fuerte capacidad antioxidante.

Únicamente el aceite esencial de *S. intricata* ha mostrado capacidad antimicrobiana, por lo que se ha determinado la concentración mínima inhibitoria (MIC) frente a dos bacterias importantes en el ámbito alimentario (*E. coli* y *L. monocytogenes*). Se ha calculado una CMI de 3,41 mg/mL frente a *L. monocytogenes*, y de 6,81 mg/mL frente a *E. coli*.

Los resultados obtenidos tanto en los análisis de capacidad antioxidante como en los de capacidad antimicrobiana del aceite esencial de *S. intricata*, muestran que sería interesante ampliar los estudios y evaluar su posible utilización en envases alimentarios.

Abstract

In this final degree project, the extraction of *Satureja intricata* plant material has been optimized for its analysis by solid-phase microextraction coupled to gas chromatography (SPME-GC-MS). Terpenoid compounds with antimicrobial and/or antioxidant properties have been identified and quantified. The results obtained show differences in the chemical composition (terpenoids) of the plant material depending on the season in which they were collected (September or April), as well as between plant parts (leaf or flower). We have seen the need to quantify the terpenoid compounds, and not to work with the % area obtained in the chromatogram, in order to really know the compounds, found in higher concentration in the methanolic extracts obtained from the three samples studied.

Antioxidant capacity tests (DPPH) have been carried out with the methanolic extracts of the plant material under study, as well as with the essential oil of *S. intricata*. The results obtained show that the methanolic extracts have low/moderate antioxidant capacity, while the essential oil has a strong antioxidant capacity.

Only the essential oil of *S. intricata* has shown antimicrobial capacity, so the minimum inhibitory concentration (MIC) against two important bacteria in the food industry (*E. coli* and *L. monocytogenes*) has been determined. A MIC of 3.41 mg/mL against *L. monocytogenes* and 6.81 mg/mL against *E. coli* was calculated.

The results obtained both in the analysis of antioxidant capacity and antimicrobial capacity of the essential oil of *S. intricata* show that it would be interesting to extend the studies and evaluate its possible use in food packaging.

1. Introducción

1.1. Interés por la búsqueda de antimicrobianos y antioxidantes naturales

Las enfermedades de transmisión alimentaria son, aún a día de hoy, una gran preocupación a nivel global, debido a que son una causa importante de mortalidad en la población mundial (Radaelli et al., 2016). La Organización Mundial de la Salud (OMS) declara que la inocuidad de los alimentos supone uno de los problemas sanitarios más extendidos, y a su vez, una de las principales causas de la reducción de la productividad económica. Muchos alimentos son perecederos y necesitan protección para alargar su vida útil (Dobre, Gagiu y Niculiță, 2013). La vida útil de un alimento se define como el periodo de tiempo durante el cual este alimento mantendrá sus características sensoriales, químicas, físicas, microbiológicas y funcionales deseadas, siendo así un alimento seguro para el consumidor (Adelakun, Oyelade y Olanipekun, 2016).

Durante mucho tiempo, la industria alimentaria ha empleado aditivos no naturales para evitar el deterioro de los alimentos. La vida útil de los alimentos se ve marcada principalmente por la oxidación y el deterioro microbiano, siendo así necesario el uso de antioxidantes y antimicrobianos tanto en los alimentos como, más recientemente, en los envases que los contienen, ayudando a alargar esa vida útil. Algunos microorganismos como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella spp.* y *Bacillus cereus*, entre otros, no solo afectan a la calidad de los alimentos, si no que afectan a la salud del consumidor (Mahmud y Khan, 2018). Además, la oxidación en los alimentos produce una reducción significativa de su vida útil. Para tratar de evitar estos problemas, a lo largo de los años ha sido necesario investigar y evaluar la adición de compuestos naturales con características antioxidantes y antimicrobianas a los envases que contienen los alimentos para consumo. Dado que, el uso de productos sintéticos puede representar un peligro nutricional o sanitario en los consumidores. Es por esto por lo que cada vez se intenta utilizar aditivos, cuyo origen sea natural, en la industria agroalimentaria.

El interés en los compuestos antimicrobianos naturales está de completa actualidad, debido a la preocupación de la población por el uso de antimicrobianos sintéticos, buscando cada vez más consumir alimentos naturales, así como la creciente preocupación por la resistencia microbiana a los conservantes tradicionales (Schuenzel y Harrison, 2002). A su vez, el interés por los antioxidantes naturales se ha incrementado debido al posible efecto carcinogénico de los antioxidantes sintéticos en la comida (Decker et al., 2005) y la eficacia antioxidante de una gran variedad de compuestos fitoquímicos (Oke et al., 2009).

El uso de especias, plantas y sus aceites esenciales es una alternativa muy prometedora en la industria ligada al envasado de alimentos (food packaging). Numerosos estudios demuestran su capacidad antioxidante y antimicrobiana, debido principalmente a la presencia de compuestos fenólicos, concretamente de terpenos (Adelakun, Oyelade y Olanipekun, 2016; Prakash y Kiran, 2016). Es por esto que, el interés en el análisis fitoquímico de diversas plantas, especialmente de las plantas aromáticas, es muy importante, tanto para cuantificar los compuestos fenólicos, como para analizar la capacidad antioxidante y antimicrobiana de estas plantas y de sus aceites esenciales, con el fin de usarlos como alternativa a los antioxidantes y antimicrobianos de origen no natural.

Muchas plantas del género *Satureja* tienen estas características. Tradicionalmente han sido usadas como condimento en salchichas, estofados y otros productos cárnicos. Si bien aquí en España se utiliza como aliño de aceitunas y otros encurtidos, además de presentar propiedades medicinales como digestivo, carminativo y antiséptico natural. En medicina tradicional se han usado sus flores y hojas, en forma de infusión, para tratar ciertos malestares como náuseas, diarrea, dolores musculares e indigestiones (Kuorwel et al., 2011).

1.2. Características de la *Satureja intricata*

El género *Satureja* incluye 38 especies, distribuidas por toda la zona mediterránea y el oeste asiático (García-Rellán, Blázquez y Boira, 2015). En la Península Ibérica hay plantas del género *Satureja* que son anuales (*S. hortensis*) y plantas que son perennes (*S. montana*, *S. innota*, *S. cuneifolia* y *S. intricata*) (García-Rellán et al., 2016).

La *Satureja intricata* es un sufrútice de hasta 40 centímetros de alto, de la familia *Labiatae*, con tallos densamente pelosos. Sus hojas (2-3 mm) son obovadas, conduplicadas y dentadas, y con pelillos cortos, especialmente en el envés. Las flores son pediceladas, de color blanco y pelosas, especialmente en los nervios. La corola es de hasta 8 mm, con el labio superior entero y el inferior trífido (Figura 1).



Figura 1. *Satureja intricata*, planta, hojas y flor (fuente propia).

Esta planta florece entre los meses de junio y noviembre. Crece formando matorrales en lugares soleados, en sabinares o en quejigares sobre roca caliza, siempre por encima de los

350 metros de altitud sobre el nivel del mar y nunca por encima de los 2100 metros. Es una especie exclusiva del centro y sureste de la Península Ibérica (Ontillera et al., 2018). En la Figura 2 se muestra la distribución geográfica de *Satureja intricata* en España.



Figura 2. Distribución de *Satureja intricata* en España
(<https://www.floravascular.com/index.php?spp=Satureja%20intricata>).

Estudios preliminares han mostrado que la composición química de *Satureja intricata* presenta una gran cantidad de compuestos denominados “bioactivos”, especialmente terpenos (García-Rellán, Blázquez y Boira, 2015). Los terpenos son un grupo de sustancias químicas aromáticas, presente en una gran variedad de plantas. Estas sustancias tienen capacidad antimicrobiana y antioxidante, por lo que es interesante su estudio y su posible uso en la industria del envasado de alimentos (Skocibusic y Bezic, 2004; Eminagaoglu et al., 2007).

1.3. Compuestos bioactivos

Se denominan compuestos bioactivos aquellos compuestos presentes en las plantas que influyen en las actividades celulares y fisiológicas y que, una vez ingeridos, producen un efecto beneficioso para la salud. No se consideran nutrientes, por lo que no son necesarios en la dieta, y se encuentran en pequeñas cantidades en determinados alimentos, especialmente en los de origen vegetal. Los compuestos bioactivos presentes en plantas van desde metabolitos primarios (polisacáridos, proteínas, etc.) hasta metabolitos secundarios (fenoles, alcanos, terpenos, etc.), y han sido ampliamente usados en el campo de la industria alimentaria (Qin y Xi, 2021). Los terpenos y los fenoles presentes en las plantas aromáticas y en sus aceites esenciales, son los principales responsables de su capacidad antimicrobiana y antioxidante (Eminagaoglu et al., 2007).

En principio, los terpenos son algunos de los compuestos bioactivos mayoritarios en *Satureja intricata*, siendo además, los que más interesan debido a sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes. Los terpenos son sustancias que se forman a partir del isopreno. La síntesis de los terpenos se lleva a cabo gracias a una serie de reacciones catalizadas por un gran grupo de terpeno-sintetasas. Esta síntesis se puede producir mediante la vía del metileritritol-4-fosfato, o bien mediante la vía del mevalonato. Ambas vías forman el isopentenil

pirofosfato, compuesto a partir del cual se forman todos los terpenoides. El isopentenil pirofosfato, catalizado por la preniltransferasa, se polimeriza en prenilpirofosfatos. Éstos finalmente se convierten en terpenos (Graßmann, 2005).

Algunos de estos compuestos con mayor capacidad antioxidante son varios terpenos fenólicos como el carvacrol, timol, β -cariofileno, γ -terpineno, ρ -cimeno y linalool (Ruberto y Baratta, 2000). Respecto a la capacidad antimicrobiana de algunas otras variedades de esta planta, las más estudiadas han sido *S. montana* y *S. hortensis*, y se debe principalmente a la presencia de algunos de los compuestos ya mencionados como el carvacrol, γ -terpineno y ρ -cimeno (Koşar et al., 2008).

1.4. Uso de aceites esenciales en envases

Los aceites esenciales han sido usados desde hace mucho tiempo contra plagas agrícolas, pero cada vez es más común su uso como productos antimicrobianos y antioxidantes en los alimentos (Prakash y Kiran, 2016). Además, hoy en día los aceites esenciales se utilizan también debido a que poseen propiedades beneficiosas para la salud. Se les atribuyen propiedades como antitumorales, antidiabéticos, antiinflamatorios, analgésicos e insecticidas. Además, se investiga también la forma en la que se puede añadir a los alimentos o a los envases que contienen alimentos perecederos, con el fin de alargar su vida útil gracias a su capacidad antimicrobiana y antioxidante (Ribeiro-Santos et al., 2017).

Se sabe que los aceites esenciales contienen más de 200 compuestos, agrupándolos en una fracción volátil (aproximadamente el 95% del total) y en una fracción no volátil. Teniendo en cuenta el gran número de compuestos que tienen, es prácticamente imposible atribuir sus propiedades a un compuesto en específico. Debido a esto, se sugiere que sus propiedades se deben a un efecto sinérgico de todos sus compuestos (Radaelli et al., 2016).

Varios estudios demuestran que los aceites esenciales de diversas plantas tienen eficacia antioxidante y antimicrobiana al añadirlos directamente en el alimento o al añadirlos en los materiales de envasado, en forma de envases activos, consiguiendo mantener la calidad de alimentos como la carne, el pescado y sus productos (Dobre, Gagiu y Niculiță, 2013; Wrona et al., 2021). Aún así, la adición de aceites esenciales directamente en la matriz alimentaria es algo limitado, ya que puede provocar efectos negativos en las características organolépticas del alimento. Es por esto que su incorporación en el envase resulta interesante, ya que se mantiene la inhibición microbiana y la prevención de la oxidación, sin afectar a las características organolépticas del alimento (Hasheminya et al., 2019). Estudios llevados a cabo con extractos de *S. thymbra* muestran que tiene mayor capacidad antioxidante desde el envase activo que añadiéndolos directamente sobre éste (Choulitoudi et al., 2020).

2. Justificación y objetivos

A día de hoy, el interés por los alimentos sin aditivos sintéticos es cada vez mayor, ya que la población desea consumir alimentos más naturales. Esto lleva a la necesidad de investigar sustancias naturales que se puedan adicionar directamente al alimento o se incorporen en los envases alimentarios, con el objetivo de alargar su vida útil y no suponer ningún riesgo para el consumidor. Es importante valorar, en estas sustancias de origen natural, su capacidad antioxidante y su capacidad antimicrobiana, con el objetivo de asegurar que pueden cumplir la función deseada. Dichas sustancias, denominadas actualmente compuestos bioactivos, están presentes entre otras, en las plantas aromáticas.

En este Trabajo de Fin de Grado se fijó como objetivo principal la caracterización fitoquímica de compuestos con propiedades antioxidantes y bactericidas en material vegetal de *Satureja intricata*.

Con el fin de desarrollar este objetivo general, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- Análisis de material vegetal de hojas y flores mediante espacio de cabeza acoplado a microextracción en fase sólida con detección mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (HS-SPME-GC-MS).
- Preparación de extractos de *Satureja intricata* y análisis mediante SPME-GC-MS.
- Identificación y cuantificación de los compuestos volátiles identificados tanto por HS-SPME como por SPME.
- Cuantificación de los compuestos identificados de los que se disponga patrones en el laboratorio.
- Realización de ensayos de capacidad antioxidante de los extractos.
- Realización de pruebas de actividad microbiana de los extractos.
- Evaluación de la viabilidad de su utilización en la incorporación en un material de envase destinado a uso alimentario.

3. Material y métodos

3.1. Material vegetal de *Satureja intricata*

Para realizar este Trabajo de Fin de Grado se ha empleado material vegetal (hojas y flores) de *S. intricata* proporcionado por el profesor Jorge Juan Vicedo de la Universidad Católica de Valencia, sede San Vicente Mártir (UCSV). Este TFG se engloba en una colaboración entre ambas Universidades, en la que desde la Universidad de Zaragoza se va a llevar a cabo la caracterización fitoquímica de esta planta con el objetivo de identificar compuestos con características antioxidantes y antimicrobianas, dadas sus posibles aplicaciones en forma de aceite esencial en envases activos, que permitan alargar la vida útil de los alimentos.

El material vegetal sometido a estudio son muestras de hojas y flores recogidas en una primera tanda en septiembre de 2020 (hoja_sept y flor_sept) y en una segunda tanda en abril/mayo de 2021 (hoja_abril). En ambos casos, inmediatamente tras la toma de muestra se separaron las hojas, brotes tiernos y flores (sólo en la tanda 1) de tallos y ramas (materia descartada) y se conservaron a temperatura -15°C. Antes de enviarlas a la Universidad de Zaragoza para su análisis, se secaron en el laboratorio a temperatura ambiente (23-25°C), en condiciones de oscuridad para evitar la fotooxidación de los compuestos, hasta obtener un peso constante y posteriormente se sometieron a triturado hasta pulverización. En la Figura 3 se muestran fotografías de las diferentes etapas de tratamiento de la muestra hasta su análisis.



Figura 3. *Satureja intricata* recolectada en fresco, puesta a secar y pulverizada.

3.2. Extracción del material vegetal

Para analizar el material vegetal de *S. intricata* mediante microextracción en fase sólida acoplada a cromatografía de gases y espectrometría de masas (SPME-GC-MS) es necesaria una extracción previa. Con el objetivo de optimizar esta extracción se realizaron ensayos con diferentes cantidades de material vegetal, y dos extractantes diferentes (metanol y etanol).

De acuerdo con trabajos anteriores llevados a cabo en el grupo de investigación (Wrona et al., 2019; Asensio et al.; 2020) con otra variedad de planta (*Arctostaphylos uva-ursi*), el porcentaje de extractante probado fue metanol (MeOH) al 80%. Se llevó a cabo una primera tanda donde se extrajeron 0,05 g y 0,1 g de material vegetal con 10 mL de MeOH al 80%. A

continuación, una vez seleccionada la relación material vegetal/volumen de extractante se llevó a cabo una segunda tanda con 0,05 g de material vegetal y 10 mL de MeOH al 80% y etanol (EtOH) al 80%, con objeto de seleccionar el extractante más adecuado.

Los extractos se prepararon en viales de rosca de 20 mL donde, sobre la muestra pesada en balanza analítica, se añadió el extractante (10 mL) con control gravimétrico. A continuación, se metieron los viales durante 30 min en un baño de ultrasonidos sin calentamiento. Una vez transcurrido el tiempo, los extractos se filtraron a través de filtro de jeringa de Teflón de 0,20 μm tamaño de poro. Los extractos filtrados se guardaron refrigerados a 4°C hasta su análisis. Señalar que los extractos se prepararon y analizaron en tiempo no superior a las 48 h.

3.3. Obtención aceite esencial de *Satureja intricata*

La preparación del aceite esencial de *S. intricata* se llevó a cabo en la Universidad Católica de Valencia, sede San Vicente Mártir (UCSV). El procedimiento de obtención fue el siguiente: las muestras de material vegetal congeladas y pulverizadas se descongelaron a temperatura ambiente y se destilaron según las normas de la farmacopea para la ajedrea de huerto, que implican 3 horas de hidrodestilación con equipo Clavenger. Las muestras se recolectaron del hidrodestilador y se conservaron a 4°C hasta su envío a la Universidad de Zaragoza. Una vez recibidas las muestras de aceite esencial se siguieron guardando a 4°C hasta su utilización.

3.4. Análisis del material vegetal mediante SPME-GC-MS

El análisis de los extractos se realizó mediante microextracción en fase sólida acoplada a cromatografía de gases (SPME-GC-MS). Con el objetivo de cubrir la identificación del mayor número de compuestos, los análisis se realizaron con dos tipos de fibras SPME: fibra DVB/CAR/PDMS (fibra gris) adecuada para analitos volátiles con polaridad intermedia, y fibra PDMS (fibra roja) para analitos volátiles con características apolares. Para la utilización de este tipo de fibras, el extracto no debe tener una concentración superior al 20% en MeOH (Asensio et al., 2019). En la preparación de los extractos con este %, se tomaron 1,98 g de extracto metanólico (al 80%) y se le adicionaron 5,94 g de agua, obteniendo así un extracto con un 20% en MeOH.

Las condiciones para el análisis SPME-GC-MS fueron las que se describen a continuación:

- Módulo SPME (CTC Analytics CombiPal autosampler): fibra SPME (gris y roja), agitación a 500 rpm, tiempo de incubación 2 min, temperatura 60°C, tiempo de extracción 15 min y tiempo de desorción 2 min.
- Cromatógrafo GC-MS (Agilent 6809N) con detector de espectrometría de masas MS 5975B): columna capilar HP-5 (Agilent Technologies, Madrid, Spain). Programa del horno

cromatográfico: 50°C durante 5 min, rampa 5°C/min hasta los 100°C, rampa 10°C hasta los 300°C y mantener 1 min. Tiempo de análisis 37 min. Adquisición en modo SCAN ($m/z = 50-800$). La identificación de los compuestos volátiles se llevó a cabo utilizando la biblioteca de espectros presente en el software del equipo (NIST Chemistry WebBook).

3.5. Análisis del material vegetal mediante HS-SPME-GC-MS

Con el objetivo de completar el análisis del material vegetal objeto de estudio en este TFG, las muestras se analizaron además, mediante espacio de cabeza (Head Space) acoplado a cromatografía de gases (HS-SPME-GC-MS). En un vial de 20 mL se pesaron 0,2 g de muestra (hoja_sept y flor_sept) y se analizaron directamente. El programa HS-SPME seguido fue el mismo que se describe en el apartado anterior.

3.6. Ensayos de capacidad antioxidante

La oxidación de los lípidos en los alimentos se produce mediante una reacción de propagación de radicales libres. A partir de ácidos grasos y oxígeno se forman hidroperóxidos. Esto es una reacción en cadena, ya que al formarse un hidroperóxido se forma también un radical libre, que sigue reaccionando con otros lípidos. Los antioxidantes son compuestos que cortan estas reacciones, ya que se oxidan ellos en vez de dejar que se oxiden más lípidos (Kuchibhotla y Rao, 1995). La capacidad antioxidante que presenta esta planta es debida a los diferentes compuestos bioactivos que contiene, especialmente los terpenos fenólicos de los que se ha hablado anteriormente.

De los diferentes ensayos con los que se puede llevar a cabo la evaluación de la capacidad antioxidante de un extracto, se seleccionó el método del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH). Este radical libre es susceptible de reaccionar con las sustancias con carácter antioxidante, mediante un proceso en el cual el antioxidante cede un átomo de hidrógeno al DPPH. Los resultados se expresan con el valor IC50, que indica la concentración de muestra necesaria para producir una inhibición del 50% del radical libre.

3.6.1. Capacidad antioxidante extractos metanólicos de *Satureja intricata*

Se comenzó determinando la capacidad antioxidante de los extractos del material vegetal al 80% en MeOH. El procedimiento seguido fue el que se describe a continuación, de acuerdo con un trabajo anterior llevado a cabo por Wrona et al., (2019): en un vial de 20 mL se añaden 3,5 mL de DPPH (30 µg/g), y a continuación se adicionan 100 µL de diferentes diluciones (cinco en cada caso) del extracto metanólico, para cada una de las muestras estudiadas: hoja y flor_septiembre y hoja_abril. Se agita durante 1 min y se deja reposar 14 min en oscuridad. Una vez transcurridos los 15 min totales, se mide la absorción a una longitud de onda de 517 nm en un equipo de espectrofotometría de absorción molecular UV/Vis (UV-1700 PharmaSpec,

Shimadzu). En cada tanda de análisis se lleva a cabo un blanco de ensayo; donde sobre 3,5 mL de disolución DPPH (30 µg/g) se adicionan 100 µL de MeOH al 80%. La medida de absorbancias se lleva a cabo empezando por el blanco seguido de las diluciones de mayor a menor.

Un vez medidas las absorbancias, se calcula el porcentaje de intensidad obtenida (% I) de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% I = \frac{A_{blanco} - A_{muestra}}{A_{blanco}} \times 100$$

Posteriormente, se representa el % I frente a las diluciones preparadas, obteniendo la correspondiente curva de calibración, y para calcular el valor IC50 se sustituye en la ecuación de la recta obtenida para un valor de dilución del 50%. Los ensayos para llevar a cabo la determinación de la capacidad antioxidante se llevaron a cabo al menos por triplicado, para cada tipo de muestra estudiada (hoja y flor, septiembre y abril).

3.6.2. Capacidad antioxidante aceite esencial de *Satureja intricata*

En el caso del aceite esencial obtenido de la muestra hoja_abril de *S. intricata*, el procedimiento seguido para la determinación de la capacidad antioxidante fue el que se describe a continuación: en un vial de 20 mL se añaden 3,5 mL de DPPH (30 µg/g), y a continuación se adicionan 100 µL de diferentes diluciones (cinco en cada caso) del aceite esencial puro. Se agita durante 1 min y se deja reposar 14 min en oscuridad. Una vez transcurridos los 15 min totales, se mide la absorción a una longitud de onda de 517 nm. En este caso, el blanco se realiza con 3,5 mL de disolución DPPH (30 µg/g) y con 100 µL de MeOH.

3.7. Ensayos de capacidad antimicrobiana

El método seleccionado para evaluar la capacidad antimicrobiana de la *S. intricata* es el método Kirby-Bauer (método de difusión en agar). Sobre la superficie de una placa de Petri con medio Brain Heart Infusion (BHI) para *L. monocytogenes* y medio Müller-Hinton (MHB) para *E. coli*, inoculada con una cantidad estandarizada de bacteria/s ($1 \cdot 10^8$ UFC/mL) se coloca un disco impregnado con 30 µL (2 veces 15 µL) del extracto metanólico o del aceite esencial. Se incuban las placas 24 h a 37°C. Transcurrido ese tiempo se evalúa la aparición o no de un halo de inhibición de la bacteria estudiada alrededor del disco. Se pueden estudiar hasta cuatro discos por placa de Petri inoculada.

Se comenzó evaluando la capacidad antimicrobiana en los extractos del material vegetal en MeOH al 80%. Para ello, se seleccionaron dos tipos de bacterias muy importantes desde el punto de vista de la seguridad alimentaria: *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*). Los ensayos se llevaron a cabo con extractos metanólicos al 80% de hoja_flor_septiembre y hoja_abril. Los ensayos de capacidad antimicrobiana se realizaron antes de

transcurrir las 24 h de preparación de los extractos metanólicos. En el caso del aceite esencial, éste se evaluó directamente impregnando los discos tal y como se ha descrito anteriormente.

Si las muestras estudiadas presentan capacidad antimicrobiana en los ensayos descritos en el apartado anterior, se realiza un segundo ensayo para cuantificar, de manera más precisa, la concentración que presenta capacidad antimicrobiana. En una placa de 96 pocillos se preparan, por duplicado, diluciones del antimicrobiano (extracto o aceite esencial, según salgan los resultados preliminares). La primera dilución se prepara con 16 μL de extracto con posible capacidad antimicrobiana, 40 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) y 946 μL de medio Brain Heart Infusion (BHI) para *L. monocytogenes* y medio Müller-Hinton (MHB) para *E. coli*. Con esto se consigue una concentración inicial de extracto antimicrobiano de 16.380 nL/mL. En la placa de 96 pocillos, se adicionan en la primera fila 50 μL de medio (BHI o MHB) y 50 μL de la primera dilución preparada del antimicrobiano, por lo que su concentración es de 8.190 nL/mL. Se realizan diluciones seriadas, es decir, de la primera dilución se toman 50 μL y se adicionan en el siguiente pocillo siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente, y así sucesivamente. Por lo que el ensayo se lleva a cabo con las siguientes concentraciones de antimicrobiano: 8.190, 4.095, 2.048 y 1.024 nL/mL. Por último, en cada uno de los pocillos se adicionan 50 μL del inóculo, de cada una de las dos bacterias estudiadas, con una concentración de 10^6 UFC/mL. Se incuban durante 24 horas a 37°C , y una vez transcurrido este tiempo se verifica si existe o no crecimiento bacteriano (turbidez en el pocillo). La concentración mínima inhibitoria (CMI) se define como la concentración mínima donde no hay crecimiento visible.

4. Resultados y discusión

4.1. Selección de las condiciones óptimas para la extracción del material vegetal de *Satureja intricata*

4.1.1. Selección de la cantidad de muestra a extraer

Tal y como se ha mencionado en el apartado material y métodos, lo primero que se hizo fue seleccionar la cantidad de materia vegetal a analizar (0,05/0,1 g) y el agente extractante (MeOH/EtOH). Para estos ensayos se trabajó sólo con el material vegetal de la tanda 1: hoja y flor_septiembre. Los extractos obtenidos fueron analizados mediante SPME-GC-MS con las condiciones que se describen en el apartado 3.4. En las Figuras 4 y 5 se muestran los resultados obtenidos en hoja y flor con las dos cantidades de material vegetal ensayadas (0,05 y 0,1 g). Señalar que los cromatogramas están superpuestos y ligeramente desplazados para poder apreciar las diferencias entre ellos.

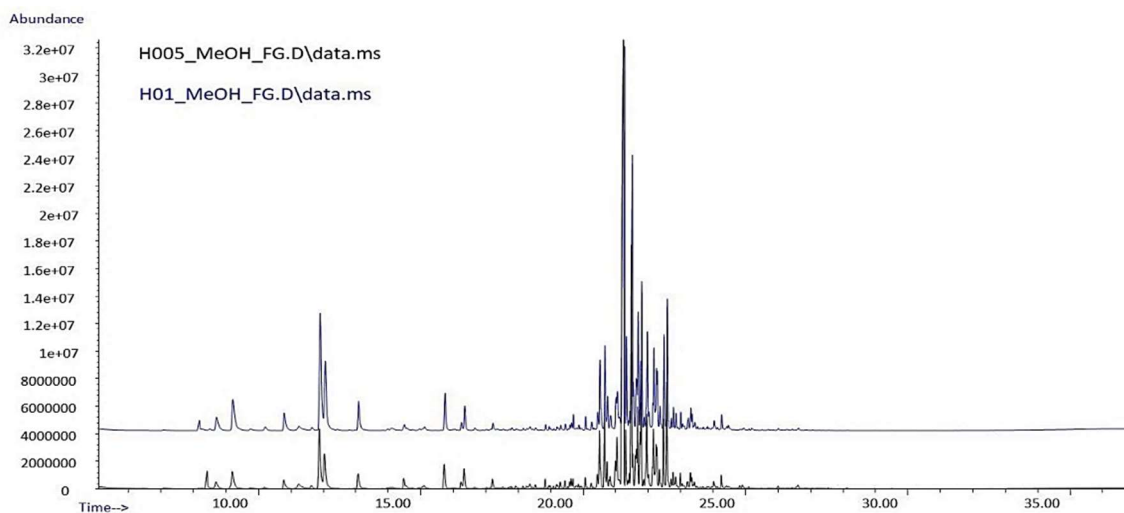


Figura 4. Cromatogramas análisis SPME-GC-MS extractos hoja_sept (0,05 g/0,1 g) con MeOH.

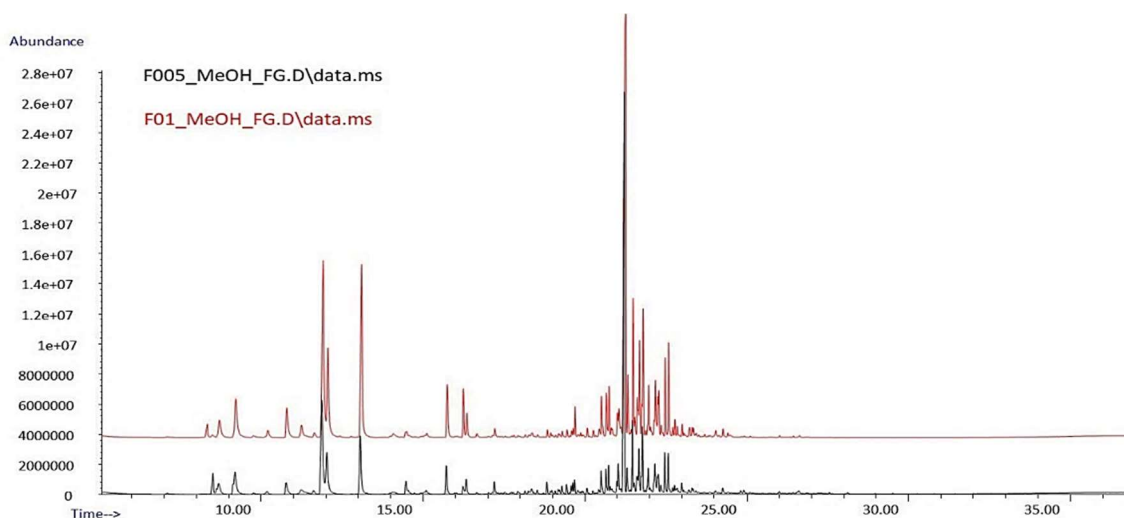


Figura 5. Cromatogramas análisis SPME-GC-MS extractos flor_sept (0,05 g/0,1 g) con MeOH.

En las Figuras 4 y 5 puede observarse que cuando se extrae 0,1 g de material vegetal con 10 mL de MeOH al 80% se identifican mayor cantidad (picos más grandes) de compuestos más volátiles (del minuto 9 al minuto 18); mientras que a partir de ese tiempo y hasta el final del cromatograma la cantidad de compuestos identificados es la misma, tanto si se trabaja con 0,05 g como con 0,1 g. Por ello, se decidió seguir trabajando con 0,05 g de material vegetal y 10 mL de extractante al 80%, de acuerdo con el trabajo llevado a cabo por Wrona et al. (2019) y que permite la correcta extracción de los compuestos con la menor cantidad de material vegetal.

4.1.2. Selección del agente extractante

Para la selección del agente extractante, se extrajeron 0,05 g de material vegetal con 10 mL de MeOH 80% y EtOH 80%, con objeto de seleccionar el más adecuado. En las Figuras 6 y 7 se comparan los cromatogramas obtenidos en cada caso, para los extractos de hoja y flor_septiembre.

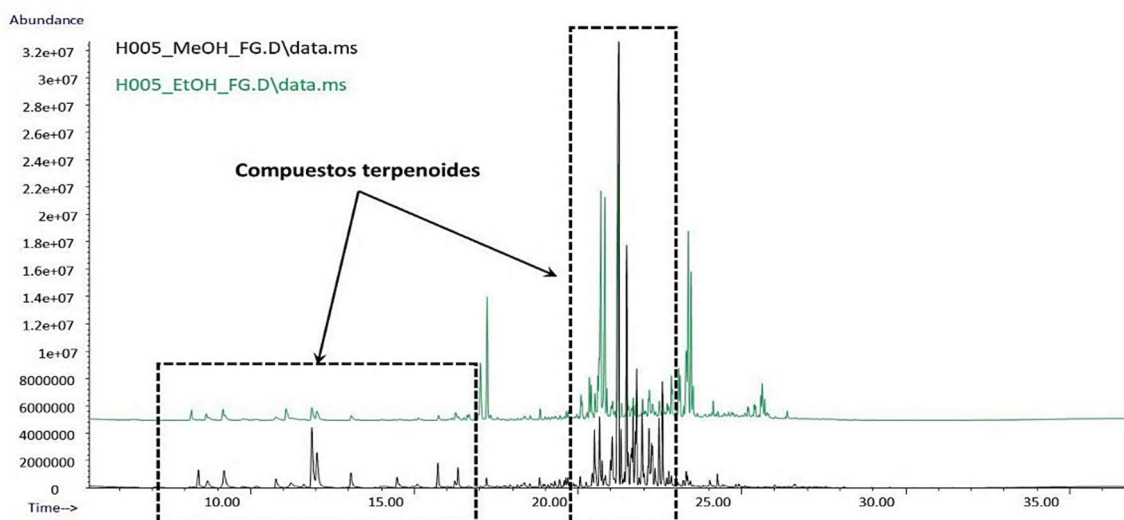


Figura 6. Cromatogramas SPME-GC-MS extractos hoja_sept (0,05 g) con MeOH y EtOH.

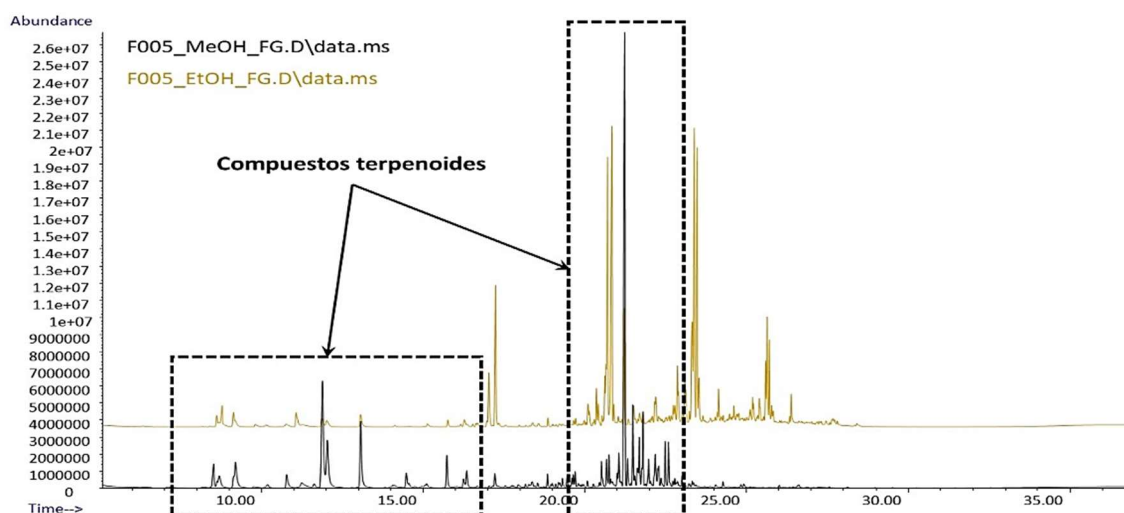


Figura 7. Cromatogramas SPME-GC-MS extractos de flor_sept (0,05 g) con MeOH y EtOH.

En las Figuras 6 y 7 puede observarse que cuando se utiliza etanol se identifican menor número y cantidad de compuestos, especialmente los compuestos de interés en este estudio que son los terpenoides, tal y como se han marcado en los cromatogramas. Por ello, se seleccionó como agente extractante MeOH al 80%.

4.1.3. Selección de la fibra SPME para el análisis mediante SPME-GC-MS

Una vez seleccionada la cantidad de muestra a extraer y el agente extractante más adecuado para el tipo de compuestos de interés, lo último que se llevó a cabo fue la selección de la fibra SPME para llevar a cabo el análisis mediante SPME-GC-MS. Para ello, se analizaron extractos de hoja y flor_septiembre (0,05 g extraídos con 10 mL MeOH al 80%) con dos fibras SPME: gris (polaridad intermedia) y roja (apolar), con objeto de seleccionar la más adecuada para la determinación de compuestos terpenoides. En las Figuras 8 y 9 se muestran los cromatogramas obtenidos.

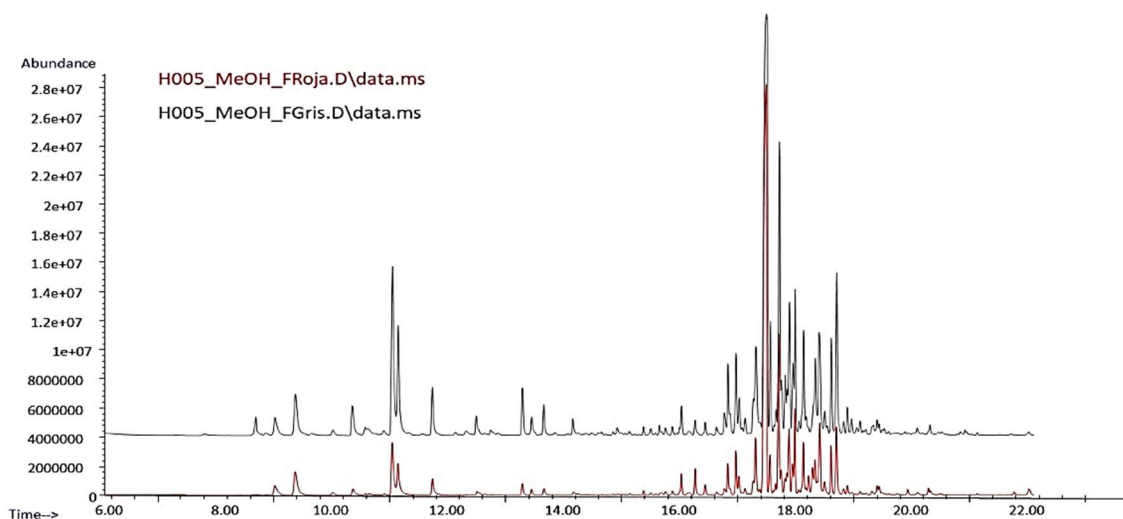


Figura 8. Cromatogramas análisis SPME-GC-MS (fibra gris y roja) extracto hoja_sept MeOH.

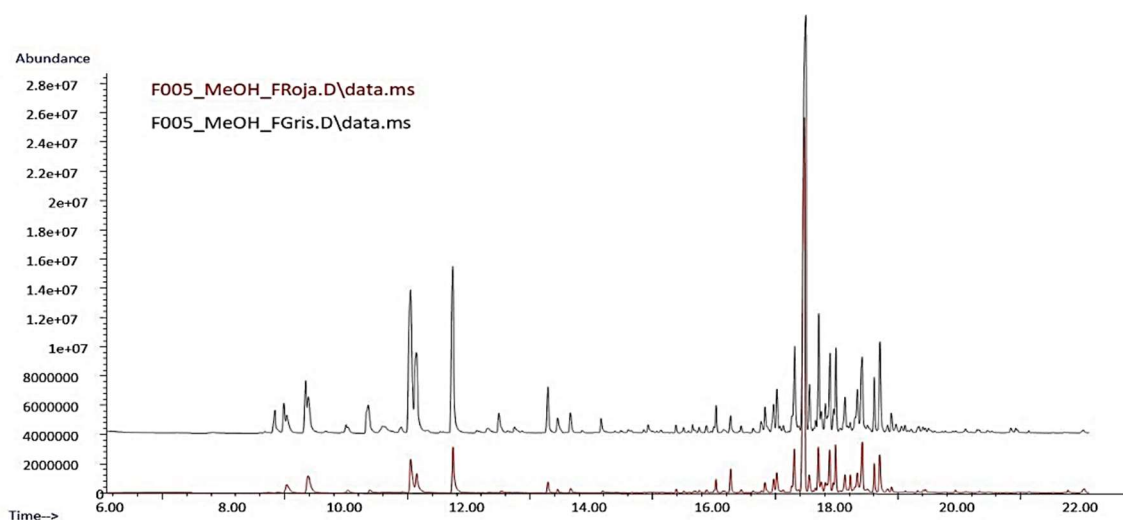


Figura 9. Cromatogramas análisis SPME-GC-MS (fibra gris y roja) extracto flor_sept MeOH.

En la comparación de cromatogramas se puede observar claramente que la cantidad de compuestos extraídos con la fibra gris es mayor que con la fibra roja, principalmente para los compuestos más volátiles (primer tramo del cromatograma). Además, hay algunos compuestos que sólo se han detectado cuando se utiliza la fibra gris. Se seleccionó la fibra gris SPME (DVB/CAR/PDMS) como la más adecuada para llevar a cabo la caracterización fitoquímica de compuestos con capacidad antioxidante y antimicrobiana en extractos de *S. intricata*.

4.2. Análisis del material vegetal de *Satureja intricata* mediante SPME-GC-MS

Con las condiciones óptimas establecidas anteriormente: 0,05 g de muestra extraídos con 10 mL de MeOH al 80% y análisis mediante SPME-GC-MS con fibra gris, se analizaron las muestras sometidas a estudio: hoja y flor_sept y hoja_abril. En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos de la identificación de compuestos en los extractos metanólicos. Además, se han señalado aquellos compuestos que se ha confirmado su identificación con el correspondiente patrón.

La identificación de los compuestos volátiles detectados mediante SPME-GC-MS se realizó mediante comparación de los espectros de masas de acuerdo con la biblioteca NIST Mass Spectral Library. Se requirió que los espectros de masas coincidieran con los tres iones principales del estándar y el porcentaje de coincidencia de la biblioteca NIST fuese > 85%. Una vez identificados los compuestos, para los que se disponía de estándar en el laboratorio se prepararon disoluciones patrón y se corroboró su identificación mediante análisis SPME-GC-MS en las mismas condiciones que los extractos de muestra. Los compuestos patrón preparados fueron: α -pineno, canfeno, β -pineno, *p*-cimeno, D-limoneno, γ -terpineno, terpinoleno, linalool, alcanfor, terpinen-4-ol, α -terpineol, timol, β -cariofileno y α -humuleno.

En la Tabla 1 puede verse que la mayoría de los compuestos identificados mediante SPME-GC-MS son compuestos terpenoides, tal y como cabía esperar, de acuerdo con estudios anteriores llevados a cabo con diferentes variedades de *Satureja* (Mohammadhosseini et al., 2016; Yayli et al., 2018). Muchos de estos terpenoides tienen propiedades antimicrobianas y/o antioxidantes, tal y como puede comprobarse en la base de datos de la Environmental Protection Agency (EPA). Por lo que, puede considerarse que la *S. intricata*, tanto la hoja como la flor, presenta potencial capacidad para su utilización como agente antimicrobiano y/o antioxidante.

Tabla 1. Compuestos identificados en extractos de *Satureja intricata* analizados mediante SPME-GC-MS. ⁽¹⁾ identificados con patrón.

tr (min)	Compuesto	CAS#	Tipo terpeno	Propiedades	Hoja_sept	Flor_sept	Hoja_abril
8,49	α -tujeno	2867-05-2	monoterpeno		X	X	X
8,70	α -pineno ⁽¹⁾	7785-70-8	monoterpeno		X	X	X
9,21	canfeno ⁽¹⁾	79-92-5	monoterpeno		X	X	X
10,20	β -pineno ⁽¹⁾	127-91-3	monoterpeno		X	X	X
10,79	β -mirceno	123-35-3	monoterpeno	antimicrobiano	X	X	X
11,63	α -terpineno	99-86-5	monoterpeno		X	X	X
11,90	p -cimeno ⁽¹⁾	99-87-6	monoterpeno	antioxidante, antimicrobiano	X	X	X
12,05	D-limoneno ⁽¹⁾	138-86-3	monoterpeno cíclico	insecticida, herbicida	X	X	X
12,39	trans- β -ocimeno	3779-61-1	monoterpeno		-	-	X
12,74	β -ocimeno	13877-91-3	monoterpeno		-	-	X
13,09	γ -terpineno ⁽¹⁾	99-85-4	monoterpeno		X	X	X
14,07	terpinoleno ⁽¹⁾	586-62-9	monoterpeno		X	X	X
14,43	linalool ⁽¹⁾	78-70-6	alcohol terpeno	fungicida, insecticida	-	-	X
14,47	undecano	1120-21-4		antimicrobiano	-	-	X
15,37	(4E,6Z) 2,6-dimetil-2,4,6-octatrieno	7216-56-0			-	-	X
15,74	alcanfor ⁽¹⁾	76-22-2	terpenoide	antimicrobiano, insecticida	X	X	X
16,34	endo-borneol	507-70-0	terpenoide bicíclico	insecticida	X	X	X
16,66	terpinen-4-ol ⁽¹⁾	562-74-3	monoterpeno		X	X	X
17,01	α -terpineol ⁽¹⁾	98-55-5	monoterpeno		X	X	-
17,54	2,6-dimetil-undecano	17301-23-4			X	X	X
17,81	bornil formato	7492-41-3			X	X	X
18,12	metil carvacrol	6379-73-3		antioxidante, antimicrobiano	-	-	X
18,53	2,4-dimetil-dodecano	6117-99-3		antimicrobiano	X	X	X
18,84	2,6,11-trimetil-dodecano	31295-56-4		antimicrobiano	X	X	X
18,95	bornil acetato	76-49-3			X	X	X
19,09	4,6-dimetil-dodecane	61141-72-8		antimicrobiano	X	X	X
19,86	γ -elemeno	29873-99-2	sesquiterpeno		X	X	X
20,07	α -cubebeno	17699-14-8	sesquiterpeno		X	X	X
20,26	cloveno	469-92-1	sesquiterpeno		X	X	X
20,44	ylangeno	14912-44-8	sesquiterpeno		X	X	X
20,51	α -copaeno	3856-25-5	sesquiterpeno tricíclico		X	X	X

20,66	(-)- β -bourboneno	5208-59-3	sesquiterpeno		X	X	X
20,74	β -elemeno	515-13-9	sesquiterpeno		X	X	X
20,84	1H-cicloprop[e]azulene,1a,2,3,4,6,7,7a,7b-octahidro-1,1,4,7-tetrametilo	405112-35-8			-	-	X
21,08	α -gurjuneno	489-40-7	sesquiterpeno		X	X	X
21,26	β -cariofileno ⁽¹⁾	87-44-5	sesquiterpeno bicíclico		X	X	X
21,32	isogermacreno D	357414-37-0			-	-	X
21,45	α -maalieno	489-28-1		antioxidante	X	X	X
21,49	aromandendreno	489-39-4			X	X	X
21,56	selina-5,11-dieno	52026-55-8			-	-	X
21,62	isocariofileno	NIST 140072			-	-	X
21,69	α -humuleno ⁽¹⁾	6753-98-6	sesquiterpeno monocíclico	insecticida	X	X	X
21,80	allo-aromandendreno	25246-27-9			X	X	X
21,88	β -copaeno	NIST 374189			-	-	X
21,96	γ -muuroleno	30021-74-0			X	X	X
22,06	(-)-germacrene A	23986-74-5			-	-	X
22,17	longifoleno-(V4)	61262-67-7			X	X	X
22,29	(+)-ledeno	21747-46-6			X	X	X
22,48	γ -cadineno	39029-41-9	sesquiterpeno		X	X	X
22,58	δ -cadineno	483-76-1	sesquiterpeno		-	-	X
22,63	β -gurjuneno	17334-55-3	sesquiterpeno		-	-	X
22,78	α -cadineno	24406-05-1	sesquiterpeno		X	X	X
22,85	α -calacoreno	21391-99-1	sesquiterpeno		X	X	X
23,12	β -maalieno	489-29-2	sesquiterpeno		-	-	X
23,21	palustrol	5986-49-2	sesquiterpeno		-	-	X
23,23	cariofileno alcohol	913176-41-7			-	-	X
23,31	espatulenol	6750-60-3	alcohol sesquiterpeno tricíclico		X	X	X
23,35	óxido de cariofileno	1139-30-6		antimicrobiano	-	-	X
23,83	α -corocaleno	20129-39-9	sesquiterpeno		-	-	X
24,03	cariofiladienol II	19431-79-9			-	-	X
24,21	α -cadinol	481-34-5	alcohol sesquiterpeno		-	-	X
24,47	cadaleno	483-78-3		antioxidante, antimicrobiano	X	X	X

En los resultados mostrados en la Tabla 1 se aprecian diferencias entre las muestras de hoja y flor, así como entre las hojas recogidas en septiembre y abril. En el caso de las muestras recogidas en septiembre, hay que destacar la presencia del terpinolene sólo en los extractos de flor. Mientras que, cuando se comparan los resultados entre los dos extractos de hojas, se puede ver que se identifican hasta veintidós (22) compuestos más en las muestras recogidas en abril, que pone de manifiesto, que la cantidad de compuestos bioactivos, en este caso terpenos principalmente, es diferente según la época del año, dado que las plantas los sintetizan de acuerdo a sus necesidades (Masteli y Jerkovi, 2003; Al-Qahtani, Alfarhan y Al-Othman, 2020). Destacar que algunos de estos compuestos diferentes presentan propiedades fungicidas, insecticidas, antioxidantes y antimicrobianas, como es el caso de linalool, undecano y metil carvacrol.

García-Rellán (2013) analizó en su Tesis Doctoral las variaciones en la composición del aceite esencial de *S. intricata* recogida en diferentes meses del año. En todas las muestras analizadas encontró que el máximo de compuestos identificados se daba en junio, frente al resto de meses donde el número de compuestos identificados descendía. En este estudio, la fracción monoterpénica hidrocarbónica, en junio, diciembre y marzo mostró su mayor concentración, mientras que en septiembre mostró la menor. Dentro de este grupo de compuestos se encuentra el p-cimeno, compuesto mayoritario en el aceite esencial en los meses de diciembre y marzo. En el caso de los monoterpenos oxigenados su presencia se mantiene más o menos uniforme a lo largo del año. Por último, los sesquiterpenos (tanto hidrocarbonados como oxigenados) igualmente, se mantienen bastante estables a lo largo de todo el año. Estos resultados vuelven a poner de manifiesto la variación estacional de la composición de las plantas, en este caso del aceite esencial de *S. intricata*. Además, en esta Tesis se analizan muestras de *S. intricata* recolectadas en cuatro localidades diferentes y a diferentes alturas, y puede verse variación en la composición entre ellas, por lo que el lugar (altitud/latitud) donde crece la planta también tiene influencia sobre su composición (Asensio et al., 2020).

4.3. Análisis del material vegetal de *Satureja intricata* mediante HS-SPME-GC-MS

Además, de llevar a cabo el análisis de los extractos mediante SPME-GC-MS, se realizó el análisis mediante espacio de cabeza (Head Space) HS-SPME-GC-MS del material vegetal sometido a estudio. En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos de dicho análisis, expresados en % de área. Se comparan con los resultados obtenidos del análisis mediante SPME-GC-MS de los mismos extractos también expresados en % de área.

Tabla 2. Comparación resultados, expresados en % área, obtenidos del análisis mediante HS-SPME-GC-MS y SPME-GC-MS de muestras de *Satureja intricata*.

tr (min)	Compuesto	CAS#	Propiedades	% área HS-SPME-GC-MS			% área SPME-GC-MS		
				Hoja_sept	Flor_sept	Hoja_abril	Hoja_sept	Flor_sept	Hoja_abril
8,27	tricicleno	508-32-7		-	-	0,16	-	-	-
8,50	α -tujeno	2867-05-2		0,96	1,45	1,12	1,23	0,34	0,20
8,73	α -pineno ⁽¹⁾	80-56-8		4,11	4,89	2,30	0,94	2,93	0,97
9,28	canfeno ⁽¹⁾	79-92-5		6,83	6,78	4,40	2,30	4,83	2,20
10,18	β -pineno ⁽¹⁾	127-91-3		0,48	1,64	1,94	0,20	0,72	0,29
10,79	β -mirceno	123-35-3	antimicrobiano	8,79	7,73	5,27	0,95	1,67	2,76
11,26	β -tujeno	28634-89-1		0,90	1,55	1,17	-	-	-
11,68	α -terpineno	99-86-5	antioxidante, antimicrobiano	2,04	2,95	2,73	0,30	0,35	0,48
12,02	p-cimeno ⁽¹⁾	99-87-6	insecticida, herbicida	20,16	16,99	9,12	5,33	8,70	4,79
12,22	D-limoneno ⁽¹⁾	5989-27-5	antioxidante, antimicrobiano	8,01	7,72	3,08	3,49	5,03	1,72
12,47	trans- β -ocimeno	3779-61-1		0,51	0,95	1,22	-	-	0,52
12,82	β -ocimeno	13877-91-3		0,54	0,96	1,15	-	-	0,44
13,26	γ -terpineno ⁽¹⁾	99-85-4		5,31	11,26	10,08	1,26	7,97	6,71
13,48	(+)-trans-4-tujanol	17699-16-0		0,14	0,26	1,32	-	-	-
13,58	linalool óxido ⁽¹⁾	5989-33-3		0,38	0,20	0,10	-	-	-
14,12	terpinoleno ⁽¹⁾	586-63-0		1,54	1,84	1,48	0,13	0,35	0,17
14,51	linalool	78-70-6	fungicida, insecticida	4,33	2,51	6,01	-	-	0,08
14,78	1,2,4,5-tetrametil-benceno	95-93-2	colorante	0,12	0,18	-	-	-	-
14,87	1,2,3,4-tetrametil-benceno	488-23-3	colorante	0,18	0,29	-	-	-	-
15,47	(4E,6E)-allocimeno	3016-19-1	colorante	0,13	0,16	0,51	-	-	-
16,00	alcanfor ⁽¹⁾	76-22-2	antimicrobiano, insecticida	20,88	19,34	14,36	1,52	1,84	0,74
16,37	2,6-dimetilocta-1,5,7-trien-3-ol	29414-56-0	TTC II	0,06	0,09	0,42	-	-	-
16,57	endo(-)-borneol	507-70-0	insecticida	4,32	3,59	5,53	1,14	0,81	0,39
16,80	terpinen-4-ol ⁽¹⁾	562-74-3		1,55	1,56	2,42	0,17	0,16	0,09
17,05	α -terpineol	98-55-5		0,63	0,60	0,58	-	-	-
17,17	trans-dihidrocarvona	5948-04-9		-	-	0,21	-	-	-
17,24	dodecano	112-40-3		0,27	0,31	0,07	-	-	-
17,54	2,6-dimetil-undecano	17301-23-4	antimicrobiano	0,06	0,10	-	-	0,08	0,06
17,71	4,8-dimetil-undecano	17301-33-6	antimicrobiano	0,08	0,07	-	-	-	-

17,82	bornil formato	7492-41-3		0,20	0,11	0,09	0,10	0,07	0,04
18,06	4-isopropil-benzaldehído	122-03-2	antimicrobiano, colorante	-	-	0,04	-	-	-
18,18	metil carvacrol	6379-73-3	antioxidante, antimicrobiano	-	-	2,61	-	-	1,46
18,27	timoquinona	490-91-5	antioxidante	-	-	0,28	-	-	-
18,36	ascaridole	512-85-6	antihelmíntico	0,08	0,17	0,12	-	-	-
18,53	2,4-dimetil-dodecano	6117-99-3	antimicrobiano	0,06	0,08	0,03	0,23	0,21	-
18,84	2,6,11-trimetil-dodecano	31295-56-4	antimicrobiano	0,12	0,14	0,07	0,38	0,30	0,04
18,94	bornil acetato ⁽¹⁾	76-49-3		0,13	0,14	0,20	0,12	0,09	0,04
19,03	timol ⁽¹⁾	89-83-8	antimicrobiano	0,11	0,07	0,59	-	-	-
19,23	carvacrol ⁽¹⁾	499-75-2	antimicrobiano	-	-	1,49	-	-	-
19,87	γ -elemeno	29873-99-2		0,05	0,05	0,45	0,16	0,24	1,88
20,07	α -cubebeno	17699-14-8		0,03	0,01	0,12	0,44	0,22	0,33
20,25	cloveno	469-92-1		0,03	0,02	0,03	0,23	0,31	0,19
20,48	isobornil propionato	2756-56-1		-	-	0,18	-	-	-
20,51	α -copaeno	3856-25-5		0,11	0,05	0,51	2,67	1,08	2,08
20,66	(-)- β -bourboneno	5208-59-3		0,09	0,03	0,42	2,59	1,51	1,65
20,75	β -elemene	515-13-9		0,07	0,08	0,30	0,99	1,29	1,29
20,84	1H-cicloprop[e]azulene,1a,2,3,4,6,7,7a,7b-octahidro-1,1,4,7-tetrametilo	405112-35-8		0,03	0,05	0,14	0,54	0,41	0,73
21,07	α -gurjuneno	489-40-7		0,27	0,28	2,12	2,37	2,89	6,34
21,27	β -cariofileno ⁽¹⁾	87-44-5		2,76	1,87	5,16	32,08	28,76	18,34
21,35	isogermacreno D	357414-37-0		-	-	0,42	2,29	2,05	1,96
21,44	α -maaliene	489-28-1	antimicrobiano	-	-	0,21	0,49	0,29	0,27
21,51	aromandendreno	489-39-4		-	-	1,12	9,44	3,83	5,73
21,55	selina-5,11-dieno	52026-55-8		-	-	0,40	-	-	1,85
21,70	α -humuleno ⁽¹⁾	6753-98-6	insecticida	0,15	0,14	0,59	3,00	2,99	1,72
21,75	1,8-ciclopentadecadieno	4722-42-3		0,69	0,02	-	-	-	-
21,88	2-epi-trans- β -cariofileno	68832-35-9		0,10	0,06	-	-	-	-
21,93	γ -gurjuneno	22567-17-5		0,08	0,03	0,15	4,15	3,08	-
21,97	γ -muuroleno	30021-74-0		0,04	0,03	0,34	3,26	1,74	1,81
22,06	(-)-germacrene A	23986-74-5		-	-	0,31	-	0,38	0,76
22,18	longifoleno-(V4)	61262-67-7		-	-	0,50	2,39	2,43	3,28
22,28	(+)-ledeno	21747-46-6		0,13	0,08	1,69	1,64	2,17	6,96

22,48	γ -cadineno	39029-41-9	0,06	0,03	0,42	2,39	1,89	1,90
22,58	δ -cadineno	483-76-1	0,11	0,07	0,65	-	2,87	3,46
22,78	α -cadineno	24406-05-1	-	-	0,14	0,51	0,50	0,70
22,85	α -calacoreno	21391-99-1	-	-	0,07	0,55	0,41	0,48
23,11	β -maalieno	489-29-2	-	-	0,07	-	-	0,43
23,21	palustrol	5986-49-2	0,18	0,01	0,14	-	-	0,06
23,33	spatuleno	6750-60-3	0,19	0,06	0,72	0,50	0,18	0,17
23,40	cariofileno óxido	1139-30-6	0,24	0,01	0,13	-	-	0,11
23,65	ledol	577-27-5	-	-	0,06	-	-	-
24,11	(-)-globulol	489-41-8	-	-	0,05	-	-	-

⁽¹⁾ *identificados con su correspondiente patrón.*

Lo primero que se puede observar, es que hay mayor cantidad de compuestos y en mayor % identificados mediante HS-SPME-GC-MS, que sólo con SPME-GC-MS. Esto era de esperar porque la cantidad de muestra utilizada en el primero es de 0,2 g mientras que en el segundo es de 0,05 g. Como se puede ver, hay veintitrés (23) compuestos que se identifican exclusivamente al realizar el análisis mediante HS-SPME-GC-MS. De ellos, nueve (9) compuestos se identifican sólo en las muestras de hoja_abril, destacando la presencia del 4-isopropil-benzaldehído, metil carvacrol, timoquinona y carvacrol, todos ellos con propiedades antimicrobianas y antioxidantes. Señalar que, al igual que en el caso del análisis mediante SPME-GC-MS, el metil carvacrol únicamente aparece en las muestras de hoja_abril. Por otro lado, hay seis (6) compuestos que sólo se identifican en las muestras hoja_sept y flor_sept, destacando la presencia del 2,6-dimetil-undecano y del 4,8-dimetil-undecano, ambos con propiedades antimicrobianas. Estos resultados ponen de manifiesto que la composición de la planta varía según la época del año.

Destacar que los compuestos con un mayor porcentaje de área según método HS-SPME-GC-MS son el p-cimeno y alcanfor, del orden del 20%. Mientras que con el análisis mediante SPME-GC-MS los compuestos que mayor % de área presentan son el p-cimeno, entre el 5 y 9%, y sobre todo el β -cariofileno con un 20-30%. Estos resultados muestran la necesidad de cuantificar los compuestos, de los que se dispone de patrón, para poder confirmar la cantidad en mg/g de cada compuesto en el material vegetal.

4.4. Cuantificación de terpenos presentes en muestras de *Satureja intricata*

Una vez identificados los compuestos presentes en las muestras, se seleccionaron aquellos compuestos patrón y se prepararon las correspondientes curvas de calibración, con al menos cinco puntos de diferente concentración. En la Tabla 3 se muestran las ecuaciones de las rectas de calibrado obtenidas y rango de concentraciones estudiado.

Tabla 3. Rectas de calibrado de los terpenos seleccionados.

Compuesto	pendiente	ordenada	r ²	Rango lineal (ng/g)
α -pineno	967713	4368367	0,9976	10 – 100
canfeno	811928	4263692	0,9976	10 – 150
β -pineno	549379	1933834	0,9979	10 – 120
p-cimeno	2526775	6457459	0,9956	6 – 86
D-limoneno	3101852	14051575	0,9985	5 – 80
γ -terpineno	1863972	2685829	0,9975	7 – 103
linalool óxido	8088	228144	0,9975	30 – 130
terpinoleno	2373857	428994	0,9993	10 – 160
alcanfor	36707	8404309	0,9945	170 – 3120
isoborneol	46733	9394337	0,9942	140 – 2500
terpinen-4-ol	48445	-17138	0,9978	14 – 60
bornil acetato	927361	1273900	0,9927	5 – 65
β -cariofileno	3441803	5869846	0,9988	5 – 70
α -humuleno	1968091	2723714	0,9905	10 – 100

Con las rectas de calibrado obtenidas se procedió a cuantificar los terpenos identificados en los extractos analizados mediante SPME-GC-MS. En la Tabla 4 se muestran los resultados obtenidos, expresados en $\mu\text{g/g}$ muestra seca, con el valor medio de los tres análisis realizados y su desviación estándar.

Tabla 4. Terpenos cuantificados en los extractos analizados mediante SPME-GC-MS.

Compuesto	Concentración ($\mu\text{g/g}$ muestra seca)		
	Hoja_sept	Flor_sept	Hoja_abril
α -pineno	18,10 \pm 4,49	88,79 \pm 6,53	107,06 \pm 6,28
canfeno	53,98 \pm 9,92	175,69 \pm 12,74	290,28 \pm 14,86
β -pineno	7,02 \pm 2,09	37,14 \pm 2,40	52,37 \pm 1,62
α -terpineno*	1,59 \pm 0,86	5,07 \pm 0,82	25,37 \pm 1,13
p-cimeno	42,45 \pm 5,73	96,34 \pm 5,29	187,59 \pm 5,54
D-limoneno	20,22 \pm 2,99	40,27 \pm 5,41	54,24 \pm 1,08
γ -terpineno	11,35 \pm 1,72	113,34 \pm 15,95	366,77 \pm 12,70
linalool*	-	-	7,23 \pm 1,01
terpinoleno	-	3,79 \pm 0,21	857,63 \pm 87,15
alcanfor	551,79 \pm 87,54	1.201,34 \pm 223,56	1.728,01 \pm 62,15
endo-borneol***	288,04 \pm 71,34	333,83 \pm 53,06	643,45 \pm 54,54
terpinen-4-ol	63,45 \pm 7,47	88,19 \pm 7,93	165,75 \pm 11,50
metil carvacrol****	-	-	51,90 \pm 1,95
bornil acetato	1,52 \pm 0,37	1,82 \pm 0,40	2,85 \pm 0,68
β -cariofileno	191,06 \pm 18,38	220,24 \pm 18,97	491,70 \pm 24,55
α -humuleno	33,09 \pm 6,26	39,99 \pm 7,05	108,89 \pm 8,43

*cuantificado como γ -terpineno; **cuantificado como linalool óxido; ***cuantificado como isoborneol y ****cuantificado como p-cimeno

Como se puede apreciar en la Tabla 4, los compuestos mayoritarios son similares en las tres muestras, aunque difieren en cuanto a su concentración. En las tres muestras estudiadas (hoja_sept, flor_sept y hoja_abril) el alcanfor (551,79 $\mu\text{g/g}$; 1.201,34 $\mu\text{g/g}$ y 1.728,01 $\mu\text{g/g}$), el endo-borneol (288,04 $\mu\text{g/g}$; 333,83 $\mu\text{g/g}$ y 643,45 $\mu\text{g/g}$) y el β -cariofileno (191,06 $\mu\text{g/g}$; 220,24 $\mu\text{g/g}$ y 491,70 $\mu\text{g/g}$) son los terpenos cuantificados en mayor concentración. En el caso de flor_sept, el canfeno (175,69 $\mu\text{g/g}$) y el γ -terpineno (113,34 $\mu\text{g/g}$) están en unas concentraciones importantes frente al resto de terpenos. En la muestra hoja_abril, además de estos dos compuestos (canfeno 290,28 $\mu\text{g/g}$ y γ -terpineno 366,77 $\mu\text{g/g}$), destacan también el α -pineno (107,06 $\mu\text{g/g}$), el p-cimeno (187,59 $\mu\text{g/g}$), el terpinoleno (857,63 $\mu\text{g/g}$), el terpinen-4-ol (165,75 $\mu\text{g/g}$) y el α -humuleno (108,89 $\mu\text{g/g}$), todos ellos con concentraciones $> 100 \mu\text{g/g}$ muestra seca.

Se puede observar que, en la muestra hoja_abril, la concentración en líneas generales de todos terpenos es superior a las concentraciones de las muestras de septiembre. Esta diferencia de concentraciones, en algunos casos, puede ser del doble o incluso del triple. A su vez, hay terpenos que se cuantifican en la muestra de abril y no en las muestras de septiembre, como son el linalool o el metil carvacrol. Esto demuestra la variación en la síntesis de los

terpenos en la propia planta según las distintas épocas del año. Además, en líneas generales, la concentración de terpenos es mayor en la muestra flor_sept que en la muestra hoja_sept, incluso en la muestra de flor aparece el terpinoleno, que en la muestra de hoja no aparece. Esto muestra, de nuevo, las diferencias en la composición de las diferentes partes de la misma planta (hoja y flor), recolectada en el mismo momento.

Por último, cabe mencionar que, a pesar de que en todas las muestras estudiadas el alcanfor es el terpeno con mayor concentración ($\mu\text{g/g}$), en ningún caso es el compuesto mayoritario según el porcentaje de área de los cromatogramas obtenidos mediante el método SPME-GC-MS (1,52%, 1,88% y 0,74%, respectivamente). Analizando únicamente el alcanfor, también se puede observar que la muestra con menor porcentaje de área (0,74% en hoja_abril), una vez cuantificado, es la muestra con mayor concentración de las tres (1.728,01 $\mu\text{g/g}$). Algo similar sucede con el β -cariofileno que en el análisis mediante SPME-GC-MS presenta el mayor % de área para las tres muestras estudiadas, si bien cuando se cuantifica no es el compuesto que se encuentra en mayor concentración (91,06 $\mu\text{g/g}$, 220,04 $\mu\text{g/g}$ y 491,07 $\mu\text{g/g}$, respectivamente).

Estos resultados muestran la necesidad de, además de identificar los compuestos y calcular su porcentaje de área, cuantificarlos con sus correspondientes patrones, para conocer la concentración real de éstos en las muestras y poder posteriormente evaluar su eficacia como sustancias con propiedades antioxidantes y/o antimicrobianas.

4.5. Resultados de los ensayos de capacidad antioxidante

Los ensayos de capacidad antioxidante se realizaron siguiendo el método del DPPH. Los resultados de este método se expresan con el valor IC50, que representa la concentración de muestra necesaria para producir una inhibición del 50% del radical libre DPPH.

En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos, para las sucesivas réplicas realizadas, con los tres extractos metanólicos preparados: hoja y flor_sept y hoja_abril, así como con el aceite esencial de *S. intricata*. Con objeto de poder evaluar mejor la capacidad antioxidante de los extractos y del aceite, y de acuerdo con lo publicado por Duarte et al., (2015) se ha calculado el índice de capacidad antioxidante, AAI (Antioxidant Activity Index):

$$AAI = \frac{\text{Conc. final DPPH control } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right)}{IC50 \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right)}$$

El cálculo del AAI permite la siguiente clasificación de la actividad antioxidante: baja ($AAI \leq 0,5$), moderada ($0,5 < AAI \leq 1,0$), fuerte ($1,0 < AAI \leq 2,0$) o muy fuerte ($AAI > 2$).

Tabla 5. Resultados de ensayos capacidad antioxidante (DPPH) en extractos.

Muestra	IC50 (%)	IC50 (mg/L)	AAI
Hoja_sept	0,171	9,010	0,38
	0,170	8,947	0,38
	0,165	8,645	0,36
	0,164	8,708	0,37
<i>media</i>	<i>0,167 ± 0,003</i>	<i>8,828 ± 0,178</i>	<i>0,37</i>
Flor_sept	0,206	10,737	0,45
	0,189	9,841	0,41
	0,195	10,197	0,43
	0,189	9,871	0,41
<i>media</i>	<i>0,195 ± 0,008</i>	<i>10,161 ± 0,416</i>	<i>0,43</i>
Hoja_abril	0,447	23,403	0,98
	0,338	17,699	0,74
	0,371	19,441	0,81
<i>media</i>	<i>0,385 ± 0,056</i>	<i>20,181 ± 2,923</i>	<i>0,85</i>
Aceite esencial	0,155	34,971	1,46
	0,150	33,780	1,41
	0,156	35,019	1,47
<i>media</i>	<i>0,154 ± 0,003</i>	<i>34,590 ± 0,702</i>	<i>1,45</i>

Como se ha comentado previamente, un AAI inferior al 0,5 indica una capacidad antioxidante baja. En los extractos de hoja y flor_sept el AAI es ligeramente inferior a 0,5 (0,37 y 0,43; respectivamente) lo que significa que dichos extractos tienen una baja capacidad antioxidante. Para el extracto hoja_abril, el AAI es de 0,85, lo que lo clasifica con una capacidad antioxidante moderada. Estos resultados muestran que los extractos metanólicos presentan una baja/moderada capacidad antioxidante, y concuerdan con la cuantificación de terpenos realizada previamente donde la mayor concentración ($\mu\text{g/g}$ muestra) se encontraba en el extracto hoja_abril, que es el que presenta capacidad antioxidante moderada. Para las muestras de septiembre, el extracto flor_sept es el que mayor cantidad de terpenos tenía frente al extracto de hoja, de acuerdo con los resultados obtenidos para la capacidad antioxidante, donde el valor de AAI de la flor es ligeramente superior al de la hoja, a pesar de mostrar ambos una baja capacidad antioxidante ($\text{AAI} < 0,5$).

Para el caso del aceite esencial, el cálculo del AAI lo clasifica con capacidad antioxidante fuerte. Es conocida que la capacidad antioxidante de los aceites esencial es alta y de ahí que se utilicen como agentes antioxidantes en la industria agroalimentaria y en food packaging (Dobre, Gagiú y Niculiță, 2013; Wrona et al., 2021). Desde un punto de vista de la utilización comercial de la *S. intricata* como agente antioxidante, estos estudios realizados muestran que es mejor utilizar aceite esencial que extractos metanólicos de la planta.

Oke et al., (2009) llevaron a cabo estudios de la capacidad antioxidante (DPPH) con extractos metanólicos y aceite esencial de *S. cuneifolia*, obteniendo unos valores de IC50 de 26,0 $\mu\text{g/mL}$ y 65,1 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Los valores calculados para este estudio son

ligeramente inferiores, en el caso de los extractos metanólicos desde 8,8 hasta 20,2 $\mu\text{g/mL}$ según la época de recogida de la muestra; y en el caso del aceite esencial presenta un valor de 34,6 $\mu\text{g/mL}$.

Ozcan et al., (2007) encontraron un valor de IC50 de 32,02 $\mu\text{g/mL}$ para el aceite esencial de *S. cilicica*. Yousefzadi et al., (2014) realizaron el cálculo del valor IC50 para *S. khuzistanica*, obteniendo un valor de 31,2 mg/mL. E igualmente Abou-Baker et al., (2020) calcularon el IC50 del aceite esencial de *S. hortensis*, obteniendo valores entre 31,62 y 56,49 mg/mL. Todos estos estudios llevados a cabo con aceites esenciales de diferentes variedades de *Satureja*, muestran valores de IC50 muy similares al calculado en este estudio para el aceite esencial de *S. intricata* (34,6 mg/mL).

4.6. Resultados de los ensayos de capacidad antimicrobiana

Los ensayos de capacidad antimicrobiana se realizaron con extractos y aceite esencial de *S. intricata* siguiendo el método Kirby-Bauer. Un resultado positivo en este método, que indica que la muestra tiene capacidad antimicrobiana, es la presencia de un halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco, previamente impregnado con la muestra.

Únicamente se obtuvieron resultados positivos con el aceite esencial, para los dos tipos de bacterias estudiados (*L. monocytogenes* y *E. coli*). En las Figuras 10 y 11 se muestran las placas Petri con los ensayos realizados con el aceite esencial y con los extractos (hoja y flor).

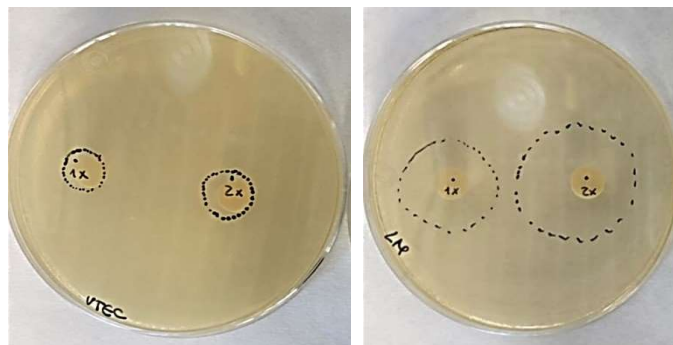


Figura 10. Presencia halos de inhibición para *E. coli* y *L. monocytogenes* (aceite esencial).

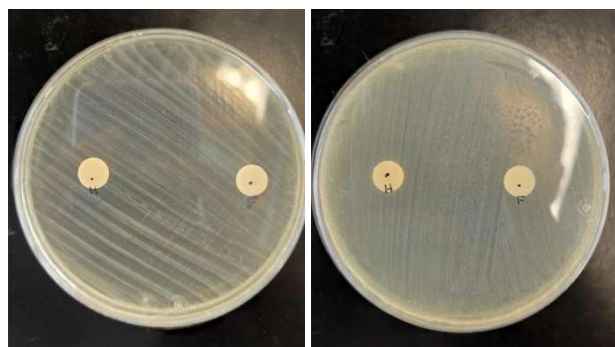


Figura 11. Ausencia halos de inhibición para *E. coli* y *L. monocytogenes* (extractos hoja y flor).

Una vez visto que los extractos no presentaban capacidad antimicrobiana, únicamente el aceite esencial, lo siguiente fue determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI). Esta prueba permite conocer la concentración mínima de muestra (aceite esencial en este caso) necesaria para producir la inhibición total del crecimiento bacteriano. Una vez transcurridas 24 h desde la realización del ensayo y manteniendo la muestra en estufa (37°C) se revisan los pocillos para ver la concentración de aceite esencial necesaria para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* y de *E. coli*, es decir, identificar los pocillos donde se aprecia turbidez (crecimiento bacteriano) Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes.

Ensayo capacidad antimicrobiana aceite esencial de *Satureja intricata*:

- Frente a *L. monocytogenes*: CMI de 4.096 nL/mL
- Frente a *E. coli*: CMI de 8.192 nL/mL

Estos resultados obtenidos coinciden con lo observado en la prueba realizada según el método de difusión en agar (Kirby-Bauer), donde se observó que el halo de inhibición era mayor en las placas inoculadas con *L. monocytogenes* que en las placas inoculadas con *E. coli*. Es decir, que el aceite esencial de *S. intricata* es más eficaz frente a *L. monocytogenes* que frente a *E. coli*, y por eso necesita menor concentración (4.096 nL/mL frente a los 8.192 nL/mL).

Con el objetivo de comparar los resultados obtenidos en este trabajo con los obtenidos en otros estudios, se han transformado los resultados de nL/mL a mg/mL. Para ello, es necesario conocer la densidad del aceite, que se calculó por triplicado dando un resultado promedio de 832 g/L. Por lo que la CMI en mg/mL es la siguiente:

- Frente a *L. monocytogenes*: CMI de 3,41 mg/mL
- Frente a *E. coli*: CMI de 6,82 mg/mL

Abou-Baker et al., (2020) llevaron a cabo un estudio donde analizaban la CMI para el aceite esencial de *S. hortensis* cultivada en Egipto, obteniendo unas CMI ligeramente menores. En concreto, 2 mg/mL para *L. monocytogenes* y 4 mg/mL para *E. coli*, frente a los 3,41 mg/mL y 6,82 mg/mL respectivamente, obtenidos en este trabajo con aceite esencial de *S. intricata*. Estos resultados concuerdan con el hecho de que para inhibir el crecimiento de *E. coli* es necesario aproximadamente el doble de concentración de aceite esencial que para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes*.

En otro estudio llevado a cabo por Vitanza et al., (2019) sobre la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *S. montana* describen que la CMI para *L. monocytogenes* se encuentra en un rango entre 0,78 y 1,56 mg/mL, y para *E. coli* en un rango entre 1,56 y 3,12 mg/mL. Al igual que el estudio anterior, los valores de CMI son ligeramente inferiores a los de nuestro trabajo, pero vuelven a poner de manifiesto que la CMI es aproximadamente el doble para *E. coli* que para *L. monocytogenes*.

Es importante señalar que los ensayos de capacidad antimicrobiana llevados a cabo en este trabajo se han realizado con aceite esencial obtenido de muestras de *S. intricata* recogidas únicamente en el mes de abril, y dado que ya se ha visto que la concentración de los terpenos identificados varía en función de la época del año (septiembre o abril), sería interesante poder analizar la composición del aceite esencial a lo largo de diferentes periodos del año, con objeto de evaluar si varía su capacidad antimicrobiana, buscando la época del año donde se obtiene el aceite esencial con menor CMI frente a las bacterias estudiadas.

5. Conclusiones

Las conclusiones a las que se llegan tras la realización de este TFG son las siguientes:

- Para la óptima extracción del material vegetal y posterior análisis mediante SPME-GC-MS es necesario trabajar con 0,05 g de muestra seca y pulverizada, extracción con 10 mL de metanol al 80%; y la selección de fibra SPME (DVB/CAR/PDMS), que es la recomendada para los analitos con polaridad intermedia. Esta fibra ha permitido la identificación y cuantificación de compuestos terpenoides en las muestras de hoja y flor de *Satureja intricata* analizadas.

- El análisis del material vegetal de *Satureja intricata* mediante SPME-GC-MS ha mostrado que la mayoría de los compuestos identificados son compuestos terpenoides. Este tipo de compuestos posee capacidad antimicrobiana y/o antioxidante, por lo que se trata de compuestos de gran interés para posteriores aplicaciones en la industria agroalimentaria, así como en el envasado de alimentos. La hoja_abril presenta hasta veintidós (22) compuestos más que las muestras de septiembre, viendo así la diferencia en cuanto a la composición en las diferentes épocas del año.

- La cuantificación de dieciséis (16) compuestos terpenoides en las diferentes muestras analizadas ha mostrado diferencias entre ellas. Siendo la hoja_abril la que presenta mayor concentración de terpenos (alcanfor 1.728,01 $\mu\text{g/g}$, terpinoleno 857,63 $\mu\text{g/g}$, endo-borneol 643,45 $\mu\text{g/g}$, β -cariofileno 491,70 $\mu\text{g/g}$, γ -terpineno 366,77 $\mu\text{g/g}$) seguida por la muestra flor_sept (alcanfor 1.201,34 $\mu\text{g/g}$, endo-borneol 333,83 $\mu\text{g/g}$, β -cariofileno 220,24 $\mu\text{g/g}$, canfeno 175,69 $\mu\text{g/g}$, γ -terpineno 113,34 $\mu\text{g/g}$).

- Se ha mostrado que los compuestos con mayor porcentaje de área al analizar los extractos mediante SPME-GC-MS no corresponden con los compuestos mayoritarios una vez cuantificados, expresados en $\mu\text{g/g}$. El alcanfor es el compuesto con mayor concentración en las tres muestras analizadas (551,79 $\mu\text{g/g}$ en hoja_sept, 1.201,34 $\mu\text{g/g}$ en flor_sept y 1.728,01 $\mu\text{g/g}$ en hoja_abril), pero en ninguno de los casos llega al 2% de área. Por otro lado, el β -cariofileno es el compuesto con mayor porcentaje de área si bien sus concentraciones son de 191,06 $\mu\text{g/g}$ en hoja_sept, 220,24 $\mu\text{g/g}$ en flor_sept y 491,70 $\mu\text{g/g}$ en hoja_abril, por debajo de otros terpenos cuantificados. Estos resultados muestran la necesidad de cuantificar los compuestos mediante SPME-GC-MS, ya que el porcentaje de área no es un dato fiable para establecer realmente la concentración de los compuestos mayoritarios.

- El análisis de la capacidad antioxidante mediante ensayo DPPH y cálculo del AAI muestra que el aceite esencial es el que mayor capacidad antioxidante presenta; con un AAI de 1,45 que lo clasifica con capacidad antioxidante fuerte. En el caso de los extractos metanólicos, la muestra hoja_abril presenta una capacidad antioxidante moderada, con un AAI de 0,85; mientras que las

muestras de hoja_sept y flor_sept presentan capacidad antioxidante baja (AAI < 0,5). Por ello, se propone utilizar el aceite esencial como antioxidante.

- El análisis de la capacidad antimicrobiana muestra que los extractos metanólicos no presentan capacidad antimicrobiana frente a ninguna de las dos bacterias estudiadas. Únicamente el aceite esencial muestra inhibición bacteriana. Se ha calculado la CMI para *L. monocytogenes* y *E. coli*, obteniendo los valores de 3,41 mg/mL 6,82 mg/mL, respectivamente.

- Como se ve en los resultados de los análisis, tanto de capacidad antimicrobiana como de capacidad antioxidante, el aceite esencial es el más interesante debido a sus buenos resultados. Es por esto por lo que sería muy interesante continuar investigando, centrándose en el aceite esencial, evaluando la posibilidad de utilizarlo como antioxidante/antimicrobiano en envases alimentarios.

Conclusions

The conclusions reached after the completion of this FDP are the following:

- For the optimal extraction of plant material and subsequent analysis by SPME-GC-MS it is necessary to work with 0.05 g of dry and pulverized sample, extraction with 10 mL of 80% methanol; and the selection of SPME fiber (DVB/CAR/PDMS), which is recommended for analytes with intermediate polarity. This fiber allowed the identification and quantification of terpenoid compounds in the *Satureja intricata* leaf and flower samples analyzed.

- The analysis of *Satureja intricata* plant material by SPME-GC-MS has shown that most of the compounds identified are terpenoid compounds. These types of compounds have antimicrobial and/or antioxidant capacity, making them compounds of great interest for further applications in the food industry, as well as in food packaging. The april_leaf presents up to twenty-two (22) more compounds than the September samples, thus showing the difference in composition at different times of the year.

- The quantification of sixteen (16) terpenoid compounds in the different samples analyzed showed differences among them. Being the april_leaf the one with the highest concentration of terpenes (camphor 1,728.01 µg/g, terpinolene 857.63 µg/g, endo-borneol 643.45 µg/g, β-caryophyllene 491.70 µg/g, γ-terpinene 366.77 µg/g) followed by the sept_flower sample (camphor 1. 201.34 µg/g, endo-borneol 333.83 µg/g, β-caryophyllene 220.24 µg/g, camphene 175.69 µg/g, γ-terpinene 113.34 µg/g).

- It has been shown that the compounds with the highest percentage area when analysing the extracts by SPME-GC-MS do not correspond with the majority compounds once quantified, expressed in µg/g. Camphor is the compound with the highest concentration in the three samples analyzed (551.79 µg/g in sept_leaf, 1,201.34 µg/g in sept_flower and 1,728.01

$\mu\text{g/g}$ in april_leaf), but in none of the cases does it reach 2% area. On the other hand, β -caryophyllene is the compound with the highest percentage area although its concentrations are 191.06 $\mu\text{g/g}$ in sept_leaf, 220.24 $\mu\text{g/g}$ in sept_flower and 491.70 $\mu\text{g/g}$ in april_leaf, below other quantified terpenes. These results show the need to quantify the compounds by SPME-GC-MS, since the area percentage is not a reliable data to really establish the concentration of the majority compounds.

- The analysis of the antioxidant capacity by DPPH assay and calculation of the AAI shows that the essential oil has the highest antioxidant capacity; with an AAI of 1.45, which classifies it as having a strong antioxidant capacity. In the case of the methanolic extracts, the april_leaf sample presents a moderate antioxidant capacity, with an AAI of 0.85; while the sept_leaf and sept_flower samples present low antioxidant capacity (AAI < 0.5). Therefore, it is proposed to use the essential oil as antioxidant.

- The analysis of the antimicrobial capacity shows that the methanolic extracts do not present antimicrobial capacity against any of the two bacteria studied. Only the essential oil shows bacterial inhibition. The MIC was calculated for *L. monocytogenes* and *E. coli*, obtaining values of 3.41 mg/mL and 6.82 mg/mL, respectively.

- As can be seen in the results of the analyses, both in terms of antimicrobial capacity and antioxidant capacity, the essential oil is the most interesting due to its good results. This is why it would be very interesting to continue research, focusing on the essential oil, evaluating the possibility of using it as an antioxidant/antimicrobial in food packaging.

6. Valoración personal

La realización de este Trabajo de Fin de Grado ha sido muy interesante para mi formación, tanto profesional como académica. He podido poner en práctica los conocimientos adquiridos a lo largo de este grado, especialmente lo relacionado con la química analítica y la microbiología. También he puesto en práctica los conocimientos de búsqueda bibliográfica.

Al tratarse de un Trabajo de Fin de Grado experimental he dedicado muchas horas para el trabajo en laboratorio, lo que considero que ha sido de gran utilidad para adquirir experiencia y autonomía trabajando. A su vez, he adquirido mucha experiencia en la optimización de los experimentos y en el análisis de datos.

Por último, agradecer a mi tutora Esther Asensio por ayudarme y enseñarme todo lo posible para realizar este trabajo, y por supuesto, por la oportunidad para realizar el Trabajo de Fin de Grado con ella.

Bibliografía

Abou-Baker, D.H., Al-Moghazy, M. y El-Sayed, A.A.A. (2020). "The in vitro cytotoxicity, antioxidant and antibacterial potential of *Satureja hortensis* L. essential oil cultivated in Egypt". *Bioorganic Chemistry*, 95. DOI: 10.1016/j.bioorg.2019.103559

Adelakun, O.E., Oyelade, O.J. y Olanipekun, B.F. (2016). "Use of essential oils in food preservation". *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, 7, pp. 71-84. DOI: 10.1016/B978-0-12-416641-7.00007-9

Al-Qahtani, H., Alfarhan, A.H. y Al-Othman, Z.M. (2020). "Changes in chemical composition of *Zilla spinosa* Forssk. medicinal plants grown in Saudi Arabia in response to spatial and seasonal variations". *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(10), pp. 2756-2769. DOI: 10.1016/j.sjbs.2020.06.035

Arrebola, M.L., Concepción, M. y Jiménez, J. (1997). "Essential oils from *Satureja obovata*, *thymus serpylloides* subsp. *serpylloides* and *T. serpylloides* subsp. *gadorenensis* micropropagated plants". *Journal of Essential Oil Research*, 9(5), pp. 533-536. DOI: 10.1080/10412905.1997.9700771

Asensio, E., Peiro, T. y Nerín, C. (2019). "Determination the set-off migration of ink in cardboard-cups used in coffee vending machines". *Food and Chemical Toxicology*, 130, pp. 61-67. DOI: 10.1016/j.fct.2019.05.022

Asensio, E., Vitales, D., Pérez, I., Peralba, L., Viruel, J., Montaner, C., Vallès, J., Garnatje, T. y Sales, E. (2020). "Phenolic compounds content and genetic diversity at population level across the natural distribution range of bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*, Ericaceae) in the Iberian Peninsula". *Plants*, 9, 1250. DOI: 10.3390/plants9091250

Bektaş, E. (2020). "Changes in essential oil composition, phenylalanine ammonia lyase gene expression and rosmarinic acid content during shoot organogenesis in cytokinin-treated *Satureja spicigera* (C. Koch) Boiss. Shoots". *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 29(3), pp. 450-460. DOI: 10.1007/s13562-020-00552-1

Choulitoudi, E., Velliopoulou, A., Tsimogiannis, D. y Oreopoulou, V. (2020). "Effect of active packaging with *Satureja thymbra* extracts on the oxidative stability of fried potato chips". *Food Packaging and Shelf Life*, 23. DOI: 10.1016/j.fpsl.2019.100455

Decker, E.A., Warner, K., Richards, M.P. y Shahidi, F. (2005). "Measuring antioxidant effectiveness in food". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), pp. 4303-4310. DOI: 10.1021/jf058012x

Dobre, A.A., Gagiú, V. y Niculiță, P. (2011). "Preliminary studies on the antimicrobial activity of essential oils against food borne bacteria and toxigenic fungi". *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati Fascicle VI—Food Technology*, 35(2), pp. 16-26.

Duarte, A., Martinho, A., Luís, A., Figueiras, A., Oleastro, M., Domingues, F.C. y Silva, F. (2015). "Resveratrol encapsulation with methyl- β -cyclodextrin for antibacterial and antioxidant delivery applications". *LWT-Food Science and Technology*, 63, pp. 1254-1260. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.04.004 0023-6438

Eminagaoglu, O., Tepe, B., Yumrutas, O., Akpulat, H.A, Daferera, D., Polissiou, M. y Sokmen, A. (2007). "The in vitro antioxidative properties of the essential oils and methanol extracts of *Satureja spicigera* (K. Koch.) Boiss. and *Satureja cuneifolia* ten". *Food Chemistry*, 100(1), pp. 339-343. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.09.054

Environmental Protection Agency (EPA). Consulta de la base de datos (julio 2021) en <https://comptox.epa.gov/dashboard/dsstoxdb/results?search=x>

García-Rellán, D. (2013). *Ecología química y actividad biológica de las especies perennes de Satureja L. en la Península Ibérica*. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de València.

García-Rellán, D., Blázquez, M.A. y Boira, H. (2015). "Differential essential oil composition and morphology between perennial *Satureja* species growing in Spain". *Records of Natural Products*, 9(4), pp. 623-627. DOI: 10.13140/RG.2.1.1356.6565

García-Rellán, D., Blázquez, M.A. y Boira, H. (2016). "Chemical composition, herbicidal and antifungal activity of *Satureja cuneifolia* essential oils from Spain". *Natural Product Communications*, 11(6), pp. 841-844. DOI: 10.1177/1934578x1601100636

Graßmann, J. (2005). "Terpenoids as plant antioxidants". *Vitamins and Hormones*, 72(5), pp. 505-535. DOI: 10.1016/S0083-6729(05)72015-X

Güllüce, M., Sökmen, M., Daferera, D., Agar, G., Özkan, H., Kartal, N., Polissiou, M., Sökmen, A. y Şahin, F. (2003). "In vitro antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, pp. 3958-3965. DOI: 10.1021/jf0340308

Hasheminya, S.M., Mokarram, R.R., Ghanbarzadeh, B., Hamishekar, H., Kafil, H.S. y Dehghannya, J. (2019). "Influence of simultaneous application of copper oxide nanoparticles and *Satureja khuzestanica* essential oil on properties of kefiran-carboxymethyl cellulose films". *Polymer Testing*, 73, pp. 377-388. DOI: 10.1016/j.polymertesting.2018.12.002

Jordán, M.J., Sánchez-Gómez, P., Jiménez, J.F., Quílez, M. y Sotomayor, J.A. (2010). "Chemical composition and antiradical activity of the essential oil from *Satureja intricata*, *S. obovata* and their hybrid *Satureja X delpozoi*". *Natural Product Communications*, 5(4), pp. 629-634. DOI: 10.1177/1934578X1000500428

Koşar, M., Demirci, B., Demirci, F. y Başer, KHC. (2008). "Effect of maturation on the composition and biological activity of the essential oil of a commercially important *Satureja* species from Turkey: *Satureja cuneifolia* Ten. (Lamiaceae)". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(6), pp. 2260-2265. DOI: 10.1021/jf0732253

Kuchibhotla, P. y Rao, B.D. (1995). "A methodology for fast scheduling of partitioned systolic algorithms". *Journal of VLSI Signal Processing*, 10(2), pp. 111-126. DOI: 10.1007/BF02407030.

Kuorwel, K.K., Cran, M.J., Sonneveld, K., Miltz, J. y Bigger, S.W. (2011). "Essential oils and their principal constituents as antimicrobial agents for synthetic packaging films". *Journal of Food Science*, 76(9). DOI: 10.1111/j.1750-3841.2011.02384.x

Mahmud, J. y Khan, R.A. (2018). "Characterization of natural antimicrobials in food system". *Advances in Microbiology*, 8, pp. 894-916. DOI: 10.4236/aim.2018.811060

Masteli, J. y Jerkovi, I. (2003). "Gas chromatography-mass spectrometry analysis of free and glycoconjugated aroma compounds of seasonally collected *Satureja montana* L". *Food Chemistry*, 80(1), pp. 135-140. DOI: 10.1016/S0308-8146(02)00346-1

Mohammadhosseini, M., Razaeei, P., Akbarzadeh, A. y Beiranvand, M. (2016). "Quantitative monitoring of the volatiles from the aerial parts of *Satureja hortensis* by the use of HS-SPME-GC-MS approach". *Oriental Journal of Chemistry*, 32(5), pp. 2559-2566. DOI: 10.13005/ojc/320527

- Oke, F., Aslim, B., Ozturk, S. y Altundang, S. (2009). "Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten". *Food Chemistry*, 112(4), pp. 874-879. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.06.061
- Ontillera, R.R., Morales, R., Dávila, P. y Molina, M. (2018). *Inventario español de los conocimientos tradicionales relativos a la biodiversidad*. Fase II (3). Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, 488, pp. 172-177.
- Ozkan, G., Simsek, B. y Kuleasan, H. (2007). "Antioxidant activities of *Satureja cilicica* essential oil in butter and in vitro". *Journal of Food Engineering*, 79(4), pp. 1391-1396. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2006.04.020
- Öztürk, M. (2012). "Anticholinesterase and antioxidant activities of Savoury (*Satureja thymbra* L.) with identified major terpenes of the essential oil". *Food Chemistry*, 134(1), pp. 48-54. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.02.054
- Prakash, B. y Kiran, S. (2016). "Essential oils: A traditionally realized natural resource for food preservation". *Current Science*, 110(10), pp. 1890-1892. DOI: 10.18520/cs/v110/i10/1890-1892
- Qin, D. y Xi, J. (2021). "Flash extraction: An ultra-rapid technique for acquiring bioactive compounds from plant materials". *Trends in Food Science & Technology*, 112, pp. 581-591. DOI: 10.1016/j.tifs.2021.04.025
- Radaelli, M., da Silva, B.P., Weidlich, L., Hoehne, L., Flach, A., da Costa, L.A. y Ethur, E.M. (2016). "Antimicrobial activities of six essential oils commonly used as condiments in Brazil against *Clostridium perfringens*". *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(2), pp. 424-430. DOI: 10.1016/j.bjm.2015.10.001
- Ribeiro-Santos, R., Andrade, M., de Melo, N.R., dos Santos, F.R., Neves, I.A., de Carvalho, M.G. y Sanches-Silva, A. (2017). "Biological activities and major components determination in essential oils intended for a biodegradable food packaging". *Industrial Crops and Products*, 97, pp. 201-210. DOI: 10.1016/j.indcrop.2016.12.006
- Ruberto, G. y Baratta, MT. (2000). "Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems". *Food Chemistry*, 69(2), pp. 167-174. DOI: 10.1016/S0308-8146(99)00247-2
- Sahraroo, A., Mirjalili, M.H., Corchete, P., Babalar, M. y Fattahi Moghadam, MR. (2015). "Establishment and characterization of a *Satureja khuzistanica* Jamzad (Lamiaceae) cell suspension culture: a new in vitro source of rosmarinic acid". *Cytotechnology*, 68(4), pp. 1415-1424. DOI: 10.1007/s10616-015-9901-x
- Schuenzel, K.M. y Harrison, MA. (2002). "Microbial antagonists of foodborne pathogens on fresh, minimally processed vegetables". *Journal of Food Protection*, 65(12), pp. 1909-1915. DOI: 10.4315/0362-028X-65.12.1909
- Sefidkon, F., Abbasi, K. y Khaniki, GB. (2006). "Influence of drying and extraction methods on yield and chemical composition of the essential oil of *Satureja hortensis*". *Food Chemistry*, 99(1), pp. 19-23. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.07.026
- Skocibusic, M. y Bezic, N. (2004). "Phytochemical analysis and in vitro antimicrobial activity of two *Satureja* species essential oils". *Phytotherapy Research*, 18, pp. 967-970. DOI:10.1002/ptr.1489

Vitanza, L., Maccelli, A., Marazzato, M., Scazzocchio, F., Comanducci, A., Fornarini, S., Crestoni, M.E., Filippi, A., Frascchetti, C., Rinaldi, F., Aleandri, M., Goldoni, P., Conte, M.P., Ammendolia, M.G. y Longhi, C. (2019). “*Satureja montana* L. essential oil and its antimicrobial activity alone or in combination with gentamicin”. *Microbial Pathogenesis*, 126, pp. 323-331. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.11.025

Wrona, M., Blasco, S., Becerril, R., Nerín, C., Sales, E. y Asensio, E. (2019). “Antioxidant and antimicrobial markers by UPLC[®]-ESI-Q-TOF-MSE of a new multilayer active packaging based on *Arctostaphylos uva-ursi*”. *Talanta*, 196, pp. 489-509. DOI: 10.1016/j.talanta.2018.12.057

Wrona, M., Silva, F., Salafranca, J., Nerín, C., Alfonso, M.J. y Caballero, M.A. (2021). “Design of new natural antioxidant active packaging: Screening flowsheet from pure essential oils and vegetable oils to ex vivo testing in meat samples”. *Food Control*, 120. DOI: 10.1016/j.foodcont.2020.107536

Yayli, B., Tosun, G., Karaköse, M., Renda, G. y Yayli, N. (2014). “SPME/GC-MS analysis of volatile organic compounds from three *Lamiaceae* Species (*Nepeta conferta* Hedge & Lamond, *Origanum onites* L. and *Satureja cuneifolia* Ten.) growing in Turkey”. *Asian journal of chemistry*, 30(18), pp. 2424-2430. DOI: 10.14233/ajchem.2014.15719

Yousefzadi, M., Riahi-Madvar, A., Hadian, J., Rezaee, F., Rafiee, R. y Biniiaz, M. (2014). “Toxicity of essential oil of *Satureja khuzistanica*: in vitro cytotoxicity and anti-microbial activity”. *Journal of Immunotoxicology*, 11(1), pp. 50-5. DOI: 10.3109/1547691X.2013.789939