



UAM-IZTAPALAPA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y DE LA
SALUD**

**“OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE *Satureja macrostema*
EXTRAÍDOS POR MICROONDAS-ULTRASONIDO Y FLUIDOS
SUPERCRÍTICOS Y SU INCORPORACIÓN EN NANOEMULSIONES”**

T E S I S

**Para obtener el título de
DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA
M. en A. NANCY ALONSO CARRILLO**

**Director
DR. FRANCISCO CRUZ SOSA**

**Asesores:
DRA. ANGÉLICA ROMÁN GUERRERO
DR. RUBÉN JIMÉNEZ ALVARADO**

Ciudad de México, Febrero de 2018

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001466”

México D.F. a 12 de Febrero del 2018

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

“OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE *Satureja macrostema* EXTRAÍDOS POR MICROONDAS-ULTRASONIDO Y FLUIDOS SUPERCRÍTICOS Y SU INCORPORACIÓN EN NANOEMULSIONES”

que presentó

M. en A. NANCY ALONSO CARRILLO

Comité de Tutores:

Director: Dr. Francisco Cruz Sosa

Asesor: Dra. Angélica Román Guerrero

Asesor: Dr. Rubén Jiménez Alvarado

Jurado:

Presidente: Dr. Fernando Rivera Cabrera

Secretario: Dr. Benoit Auguste Roger Fouconnier

Vocal: Dra. Angélica Román Guerrero

Vocal: Dr. Antonio Bernabé Antonio

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Francisco Cruz Sosa por su confianza y consejos durante el doctorado.

A la Dra. Angélica Román Guerrero por todo el apoyo brindado durante el doctorado, pero sobre todo por su confianza y amistad.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada de doctorado y por el financiamiento parcial a través del proyecto de Ciencia Básica No. 236565.

A todos mis compañeros del R-003 y W-107 por los momentos compartidos.

DEDICATORIAS

A mis padres, por su apoyo incondicional en cada una de mis decisiones a lo largo de mi vida.

A mi esposo por su amor, palabras y confianza en todo momento desde que estamos juntos.

Y a mi hijo por ser el motor de mi vida. ¡Los amo!

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	7
HIPÓTESIS GENERAL	14
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
DIAGRAMA DE DESARROLLO EXPERIMENTAL	15
CAPÍTULO I. EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS DE <i>Satureja macrostema</i> OBTENIDOS MEDIANTE REFLUJO Y MICROONDAS-ULTRASONIDO.	17
1.1 Marco teórico	18
1.2 Materiales y métodos	20
1.2.1 Material vegetal	20
1.2.2 Reactivos	20
1.2.3 Extracción de bioactivos de SM	21
1.2.3.1 Extracción por reflujo (RE)	21
1.2.3.2 Extracción por microondas-ultrasonido (MUAE)	22
1.2.4 Caracterización de extractos	23
1.2.4.1 Rendimiento de extracción	23
1.2.4.2 Contenido de fenoles totales (TPC)	23
1.2.4.3 Contenido de flavonoides totales (TFC)	23
1.2.4.4 Actividad antioxidante mediante ensayo DPPH•	24
1.2.4.5 Actividad antioxidante mediante ensayo ABTS•+	24
1.2.4.6 Perfil cromatográfico mediante LC-DAD	24
1.2.4.7 Identificación de compuestos mediante LC-MS	25
1.2.4.8 Citotoxicidad	26
1.2.4.8.1 Cultivo de linfocitos	26
1.2.4.8.2 Aislamiento de linfocitos	26
1.2.4.8.3 Ensayo rojo neutro	27
1.2.4.8.4 Ensayo MTT	27

1.2.5 Análisis estadístico	27
1.3. Resultados y discusiones	28
1.3.1 Rendimiento	28
1.3.2 Contenido de fenoles y flavonoides totales (TPC y TFC)	29
1.3.3 Actividad antioxidante	31
1.3.4 Análisis de correlación de Pearson	34
1.3.5 Perfil cromatográfico e identificación de compuestos	39
1.3.6 Citotoxicidad	42
1.4 Conclusiones del capítulo I	44
CAPÍTULO II. EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE <i>Satureja macrostema</i> Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD FUNCIONAL.	45
2.1 Marco teórico	46
2.2 Materiales y métodos	48
2.2.1 Material vegetal	48
2.2.2 Reactivos	48
2.2.3 Extracción de aceite esencial de <i>S. macrostema</i>	48
2.2.3.1 Extracción por hidrodestilación (HD)	48
2.2.3.2 Extracción con fluido supercrítico (SFE)	49
2.2.4 Caracterización del aceite esencial	49
2.2.4.1 Rendimiento de extracción	49
2.2.4.2 Actividad antioxidante mediante DPPH	50
2.2.4.3 Evaluación de la actividad antioxidante por decoloración de β - caroteno/ácido linoléico	50
2.2.5 Identificación de compuestos mediante GC/MS	50
2.2.6 Evaluación de la actividad antibacterial del aceite esencial de <i>S.</i> <i>macrostema</i>	51
2.2.6.1 Efecto inhibitorio mediante el método difusión en disco	51
2.2.6.2 Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) mediante el método de macrodilución	52
2.3 Resultados y discusiones	52

2.3.1 Rendimiento	52
2.3.2 TPC y actividad antioxidante	54
2.3.3 Caracterización del aceite esencial mediante GC-MS	56
2.3.4 Actividad antibacteriana	58
2.4 Conclusiones del capítulo II	59
CAPÍTULO III. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOEMULSIONES SIMPLES DE TIPO W/O Y O/W CONTENIENDO BIOACTIVOS DE <i>Satureja macrostema</i>	61
3.1 Marco teórico	62
3.2 Materiales y métodos	67
3.2.1 Reactivos	67
3.2.2 Preparación de nanoemulsiones W/O por emulsificación espontánea	67
3.2.3 Efecto del co-solvente y tensoactivo	68
3.2.4 Obtención de nanoemulsión O/W	69
3.2.4.1 Preparación de emulsión gruesa	69
3.2.4.2 Microfluidización	69
3.2.4.3 Caracterización de las NEs	70
3.2.4.3.1 Diámetro hidrodinámico	70
3.2.4.3.2 Potencial zeta	70
3.2.4.3.3 Turbidez	70
3.2.4.3.4 Estabilidad de NEs	70
3.2.4.3.5 Actividad antioxidante	71
3.3 Resultados y discusiones	71
3.3.1 Efecto del contenido de co-tensoactivo y tensoactivo	72
3.3.2 Estabilidad a la sedimentación de NEs W/O	76
3.3.3 Estabilidad de almacenamiento de NEs W/O	76
3.3.4 Actividad antioxidante de NEs W/O	77
3.3.5 Estabilidad al cremado de NEs O/W	78
3.3.6 Estabilidad de almacenamiento de NEs O/W	79
3.3.7 Actividad antioxidante de NEs O/W	80
3.4 Conclusiones Capítulo III	80

REFERENCIAS	82
ANEXO	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Especies de <i>Satureja</i> y sus actividades biológicas (Basado en Jafari <i>et al.</i> , 2016).	8
Figura 2. Colecta de <i>Satureja macrostema</i> , Diciembre 2015 (Santa María Lachixío, Zimatlán Oaxaca).	8
Figura 3. Estructuras químicas de compuestos aislados de <i>Satureja macrostema</i> (Pérez Gutiérrez, 2013).	9
Figura 4. Posible reacciones de conversión en aceites esenciales (Turek <i>et al.</i> 2013).	13
Figura 5. Estrategia general seguida para la realización de esta tesis.	15
Figura 1.1. Métodos de extracción de compuestos fenólicos.	19
Figura 1.2. Esquematación del sistema de extracción por reflujo (RE).	21
Figura 1.3. Esquematación del sistema de extracción mediante Microondas-Ultrasonido.	22
Figura 1.4. Cromatógrafo de líquidos Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 acoplado a un espectrómetro de masas ESI (MicroTOF II).	25
Figure 1.5. Actividad antioxidante de extractos RE (figuras superiores) y MUAE (figuras inferiores) de <i>S. macrostema</i> .	33
Figura 1.6. Perfil cromatográfico (LC-DAD) de extracto: a) RE _{E50-120min} y b) MUAE _{E100-30min} .	40
Figura 1.7. Viabilidad celular (%) de diferentes concentraciones de extractos E50-120min (RE), E100-30min (MUAE) y control vehículo (CV), obtenidos por Rojo Neutro (a) y MTT (b) comparados con un control negative (linfocitos no tratados). Misma letra indica que no hay diferencia significativa entre los tratamientos (Tuckey, p<0.05).	43
Figura 2.1. Estructura del isopreno y ejemplos de terpenos.	47

Figura 2.2. Esquematación del sistema de hidrodestilación para extracción de aceites esenciales de SM (trampa tipo Clevenger).	49
Figura 2.3. Esquematación del sistema de extracción por SFE.	49
Figura 2.4. Aceite esencial de <i>S. macrostema</i> obtenido por hidrodestilación.	52
Figura 2.5. Muestras de aceite de <i>S. macrostema</i> diluido en metanol, obtenido a diferentes presiones y temperatura constante (40°C).	54
Figura 2.6. Cromatograma obtenido por GC-MS de aceite esencial de <i>Satureja macrostema</i> .	56
Figura 3.1. Representación esquemática de clasificación de emulsiones (basado en Piorkowski y McClements, 2014).	62
Figura 3.2. Mecanismo de inestabilidad de una emulsión (Mc Clements, 2007).	63
Figura 3.3. Papeles que juegan los emulsificantes en la producción de productos comerciales basados en emulsión: (a) facilitan la formación de la emulsión y (b) favorecen la estabilidad de la emulsión (Mc Clements y Gumus, 2016).	64
Figura 3.4. Esquematación de la obtención de nanoemulsión utilizando microfluidización.	67
Figura 3.5. Diagrama esquemático del mecanismo de formación de nanoemulsiones por el método de emulsificación espontánea. Cuando la fase orgánica (aceite+ tensoactivo hidrofílico) y fase acuosa (agua) son puestos en contacto y una microemulsión bicontinua (μE) es formada en el límite, el cual se rompe y forma pequeñas gotas de aceite.	68
Figura 3.6. Emulsificación espontánea de emulsión W/O.	68
Figura 3.7. Ultra-Turrax Modelo T10 basic, IKA [®] utilizado para la formación de una emulsión gruesa.	69
Figura 3.8. Microfluidizador Nano DeBee utilizado utilizado para la formación de NEs.	69
Figura 3.9. Zetasizer utilizado para determinar radio hidrodinámico de gota de NEs.	70
Figura 3.10. Equipo lumisizer utilizado para determinar estabilidad de nanoemulsiones.	71
Figura 3.11. Estabilidad física de NEs W/O con diferentes contenidos de tensoactivos y etanol.	73

Figura 3.12. Radio hidrodinámico de gota de NEs con extracto etanólico de <i>S. macrostema</i> al 10% a diferentes concentraciones de tensoactivos.	74
Figura 3.13. Estabilidad de NEs con extracto etanólico de <i>S. macrostema</i> al 10%; a) PDI y b) absorbancia.	74
Figura 3.14. Radio hidrodinámico de gota de NEs con extracto etanólico de <i>S. macrostema</i> al 50% a diferentes concentraciones de tensoactivos.	75
Figura 3.15. Estabilidad de NEs con extracto etanólico de <i>S. macrostema</i> al 50%; a) PDI y b) absorbancia.	75
Figura 3.16. Estabilidad a la sedimentación; a) evolución de perfiles de transmisión normalizada de NE W/O, b) Transmisión integrada contra tiempo de NE W/O.	76
Figura 3.17. Estabilidad de NEs almacenadas a 4°C y 27°C.	77
Figura 3.18. Pérdida de actividad antioxidante de NEs almacenadas a 4°C y 27°C.	78
Figura 3.19. Estabilidad al cremado; a) Evolución de perfiles de transmisión normalizada de NE O/W, b) Transmisión integrada contra tiempo de NE O/W.	79
Figura 3.20. Emulsión O/W después de centrifugación en el lumisizer.	79
Figura 3.21. Estabilidad de NEs almacenadas a 4°C y 27°C.	80
Figura 3.22. Pérdida de actividad antioxidante de NEs almacenadas a 4°C y 27°C.	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clases de compuestos fenólicos en plantas de acuerdo a su cadena de carbono (Basado en Giada, 2013).	10
Tabla 2. Estructuras químicas de las principales clases de flavonoides.	12
Table 1.1 Comparación del rendimiento de extracción, contenido de fenoles y flavonoides totales correspondiente a cada técnica de extracción.	28
Tabla 1.2. Coeficientes de correlación de Pearson entre diferentes ensayos, bajo la influencia de condiciones de extracción (n=3).	36
Tabla 1.3. Compuestos identificados por LC-MS en modo ión negativo [M-H] ⁻ de extractos de <i>Satureja macrostema</i> .	41
Tabla 2.1. Comparación de rendimiento de extracción de aceite esencial de <i>S. macrostema</i> obtenido mediante HD y SFE.	53
Tabla 2.2. Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante de aceite esencial por HD.	55
Tabla 2.3. Actividad antioxidante (IC ₅₀) mediante DPPH de aceites esenciales por SFE.	56
Tabla 2.4. Composición química de aceite esencial de <i>S. macrostema</i> , comparado con <i>Satureja Montana</i> y <i>Clinopodium macrostemum</i> .	57
Tabla 2.5. Potencial antibacterial de aceite esencial de <i>Satureja macrostema</i> , evaluado usando método difusión de disco en agar y macrodilución en caldo (CMI y CMB).	59
Tabla 3.1. Diseño experimental utilizado para la elaboración de nanoemulsiones W/O conteniendo extracto de <i>Satureja macrostema</i> .	68

RESUMEN

Satureja macrostema (SM) es una planta utilizada en la medicina tradicional, y es una fuente rica en compuestos fenólicos como flavonoides. Generalmente, la obtención de estos compuestos se basa en la exposición del material vegetal en maceraciones a altas temperaturas y tiempos prolongados, lo cual conlleva a la degradación y pérdida de funcionalidad. El trabajo desarrollado se presenta en tres capítulos: en el Capítulo I, el objetivo fue evaluar el efecto de la adición de etanol en diferentes concentraciones y el tiempo de extracción sobre el rendimiento de sólidos solubles totales (SST), el contenido de fenoles totales (TPC), flavonoides (TFC) y la actividad antioxidante (AA) de extractos de SM, obtenidos mediante un método convencional de reflujo (RE) y microondas asistido con ultrasonido (MUAE). El Capítulo II tuvo como objetivo extraer la fracción no polar de SM (constituida principalmente por aceites esenciales) a través de hidrodestilación (HD) y compararla con la extracción por fluidos supercríticos (SFE), evaluar el rendimiento de extracción y la actividad antioxidante y antibacteriana. Finalmente, el Capítulo III consistió en el diseño de sistemas dispersos nanométricos para contener y proteger los compuestos bioactivos obtenidos en los capítulos I y II. Dos tipos de nanoemulsiones fueron obtenidos: agua-en-aceite (W/O) y aceite-en-agua (O/W). Los principales resultados se describen a continuación.

En el Capítulo I, se encontró que las diferencias en las variables respuesta (SST, TPC, TFC y AA) se relacionaron con la temperatura y tiempo de extracción, así como con el método de extracción, dichas diferencias se atribuyen a la afinidad y polaridad de los disolventes y de los compuestos fenólicos extraídos, así como de su termoestabilidad. Las mejores condiciones para la recuperación de estos compuestos hidrosolubles fueron obtenidas empleando etanol al 50% (v/v) durante 120 min (E50-120 min) para RE y etanol absoluto por 30 minutos (E100-30 min) para MUAE, de acuerdo con la mayor concentración de compuestos fenólicos totales (TPC) y a la menor concentración de IC₅₀ para la actividad antioxidante. Los extractos fueron caracterizados mediante HPLC-DAD y HPLC-MS, donde se encontraron ácidos fenólicos como el ácido rosmarínico (compuesto mayoritario), cafeico, coumárico, y gálico; flavonoides corroborados por estándares como la naringina y hesperidina, y flavonoides tentativos como quercetina-dimetil-miricetina, luteolina-7-O-

glucósido, apigenina, ácido coumaroilquínico, eridictiol, entre otros. Además, se les evaluó el posible efecto citotóxico a través de la determinación de la viabilidad de linfocitos aislados de sangre periférica humana en presencia de dichos extractos. No se observó ningún efecto citotóxico sobre la actividad mitocondrial y lisosomal de los linfocitos, confirmando que su consumo no representa riesgos que comprometan la viabilidad celular.

Para el Capítulo II, los resultados mostraron que el método SFE presenta ventajas sobre el método HD, principalmente debido a la obtención de un mayor rendimiento y mayor actividad antioxidante (IC_{50} de 0.91 mg/mL y 2.38 mg/mL para SFE y HD, respectivamente) en el aceite esencial extraído. Para la extracción por SFE, se encontró que las mejores condiciones de extracción fueron a una temperatura de 40°C y una presión de 3,630 psi. Para el caso de HD las condiciones de extracción involucraron temperaturas de 90°C durante 4 horas. Para el caso del aceite esencial obtenido por HD se realizó la caracterización por GC-MS, donde los dos principales compuestos identificados corresponden al óxido de piperitona (14.67%) y mentona (11.31%), compuestos que han sido relacionados con distintas actividades biológicas. Asimismo, se encontró que el aceite esencial de SM presentó actividad contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella enterica*, siendo significativamente mayor sobre el crecimiento de *S. aureus*.

Debido a que muchos compuestos bioactivos presentan diversas desventajas cuando éstos son adicionados en matrices alimentarias, aunado a que algunos de estos compuestos presentan baja solubilidad en medios acuosos, o sensibilidad al oxígeno, luz, temperatura, o desarrollan atributos sensoriales no deseables en los alimentos, el Capítulo III presenta la propuesta de incorporar los extractos hidro y lipofílicos en nanoemulsiones (NE) de tipo W/O y O/W, respectivamente.

Para el caso de las NE tipo W/O se realizó un diseño de experimental central compuesto con la finalidad de establecer las condiciones de formación de las emulsiones con diámetro hidrodinámico de gota ≤ 100 nm. Las NE tipo W/O se obtuvieron empleando una mezcla de tensoactivos no iónicos (Tween 80-Span 80 [1:3], concentración de 8.33%), aceite mineral y extracto acuoso con una fracción másica de fase dispersa del 5% (p/p); donde a través del

método de emulsificación espontánea se obtuvieron diámetros hidrodinámicos 63.8 nm y propiedades características de las nanoemulsiones (sistemas translúcidos). Para las NE tipo O/W se empleó aislado de proteína de lactosuero (WPI) como estabilizante a una concentración del 2% (p/v) y una fracción másica de fase dispersa del 1% (w/w) de aceite esencial de SM. Las condiciones de emulsificación por microfluidización fueron 15,000 psi de presión y 5 ciclos a 25°C, donde se obtuvieron tamaños de gota <200 nm. La actividad antioxidante fue evaluada en los sistemas nanoemulsificados y comparados con los extractos frescos, donde se encontró una mejora en la estabilidad y reducción en la pérdida de actividad antioxidante de los sistemas NE (W/O and O/W) durante las condiciones de almacenamiento.

ABSTRACT

Satureja macrostema (SM) is a plant widely used in traditional medicine, is a rich source of phenolic compounds such as flavonoids. Generally, obtaining these compounds is based on the vegetal material exposition to maceration at high temperatures and long times, leading to degradation and functionality loss. The work is presented in three chapters: in Chapter I the aim was to evaluate the effect of the addition of different ethanol concentrations and the extraction times over the total soluble solids yield, total phenolic content, flavonoids and antioxidant activity of SM extracts, when they were obtained by means of heat reflux conventional method (RE) and microwave couple to ultrasound technique (MUAE). Chapter II was aimed to extract the non-polar fraction of SM (mainly constituted by essential oils) through hydrodistillation (HD) and compared to super fluid extraction (SFE), evaluating the effect over the extraction yielding, antioxidant and antibacterial activities. Finally, Chapter III consisted in the nanometric dispersed systems design for containing and protecting the bioactive compounds obtained from chapters I and II. Two types of nanoemulsions were achieved: water-in-oil (W/O) and oil-in-water (O/W). The main results are described below.

In Chapter I, differences in the response variables were related to temperature and time extraction, as well as the extraction method, differences were attributed to affinity and polarity of solvents and phenolics compounds extracted, as well as their thermostability. The best conditions of extraction were at ethanol 50% (v/v) during 120 min (E50-120 min) for RE and absolute ethanol for 30 min (E100-30 min) for MUAE, agreeing with the highest total phenolics content (TPC) and the lowest IC₅₀ for antioxidant activity. The extracts were characterized by HPLC-DAD and HPLC-MS, where phenolic acids like rosmarinic (mayority compound), caffeic, coumaric, and galic acid; flavonoids corroborated against standard compounds like naringine and heperidine, y tentative flavonoids like quercetin-dimethyl-myricetine, luteoline-7-O-glucoside, apigenine, coumaroilquinic acid, and erydictiol, among others. Also, the extracts were evaluated by their possible cytotoxic effect through determination of the viability of lymphocytes isolated from human peripheral blood in contact with the extracts. No cytotoxic effect was observed over the lymphocytes

mitochondrial and lysosomal activities, confirming its ingest do not represent any risk that compromise the cellular viability.

For Chapter II, results showed that SFE have advantages over the HD method, mainly due to higher yield and antioxidant activity (IC_{50} of 0.91 mg/mL and 2.38 mg/mL for SFE and HD, respectively) in the essential oils extracted. For SFE extraction the best conditions were at 40°C and pressure of 3,630 psi. For HD the extraction conditions involved temperatures around 90°C and extraction times of 4 hours. Essential oil obtained by HD was characterized by GC-MS, the two major identified compounds corresponded to piperitone oxide (14.67%) and menthone (11.31%), and both have been related to different biological activities. Likewise, essential oils have activity demonstrated as antimicrobial agents, therefore it was found that essential oil from SM displayed antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Salmonella enterica*, finding higher inhibition in the growth of *S. aureus*.

Due to many bioactive compounds present many disadvantages when they are added into food matrices, in addition to the fact that some of these compounds have low solubility in aqueous media, or sensitivity to oxygen, light, temperature, or develop undesirable sensory attributes in foods, Chapter III presents the proposal to incorporate hydrophilic and lipophilic extracts in nanoemulsions (NEs) of type W/O and O/W, respectively.

In the case of W/O NE, a central composite design was carried out with the purpose of establishing the formation conditions of the emulsions with hydrodynamic diameter ≤ 100 nm. W/O NE were obtained using a mixture of non-ionic surfactants (Tween 80-Span 80 [1:3], concentration of 8.33%), mineral oil and aqueous extract with a mass fraction of dispersed phase of 5% (w/w); where by means of the spontaneous emulsification method, hydrodynamic diameters of 63.8 nm and properties characteristic of nanoemulsions (translucent systems) were achieved. For O/W NE, whey protein isolate (WPI) was used as a stabilizer at a concentration of 2% (w/v) and a dispersed phase mass fraction of 1% (w/w) of SM essential oil. Emulsification conditions were done by microfluidization at 15,000 psi pressure and 5 cycles at 25 °C, droplet sizes <200 nm were obtained. It is worth mentioning

that the antioxidant activity was evaluated in the nanoemulsified systems and compared with the fresh extracts, where an improvement in the stability and reduction in the loss of antioxidant activity of the NE systems was found during the storage conditions (W/O and O/W).

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el uso extensivo de la medicina tradicional en países en vías de desarrollo, así como el incremento en el uso de la medicina complementaria y alternativa en los países desarrollados, ha conducido al estudio de diversas fuentes vegetales con la finalidad de validar y corroborar científicamente que éstas contienen compuestos que ejercen una acción farmacológica sobre el ser humano y los seres vivos.

En México el uso de la medicina tradicional se remonta a la época prehispánica y actualmente, la importancia de las plantas medicinales no sólo radica en su riqueza como parte de la cultura, sino también en el conocimiento científico que se genera a partir de su estudio y del análisis que se realiza de cuestiones ecológicas, geográficas, culturales, farmacológicas y químicas que constituyen el contexto global. Según la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (Conabio), en el país se han registrado aproximadamente 4 mil especies con atributos medicinales (15% de la flora total del país), es decir, 1 de cada 7 posee alguna propiedad curativa.

En este sentido, la familia Lamiaceae es muy conocida por ser considerada una fuente rica en compuestos polifenólicos, los cuales han sido reportados por poseer un amplio rango de actividades biológicas y una amplia diversidad de fitoquímicos como aceites esenciales, ácidos hidroxicinámicos y flavonoides encontrados como los constituyentes bioactivos mayoritarios (Vladimir-Knežević *et al.*, 2014).

En esta familia se encuentra el género *Satureja*, el cual comprende más de 30 especies con una gran gama de actividades biológicas demostradas, como se muestra en la Figura 1 (Jafari *et al.*, 2016; Tepe *et al.*, 2015).

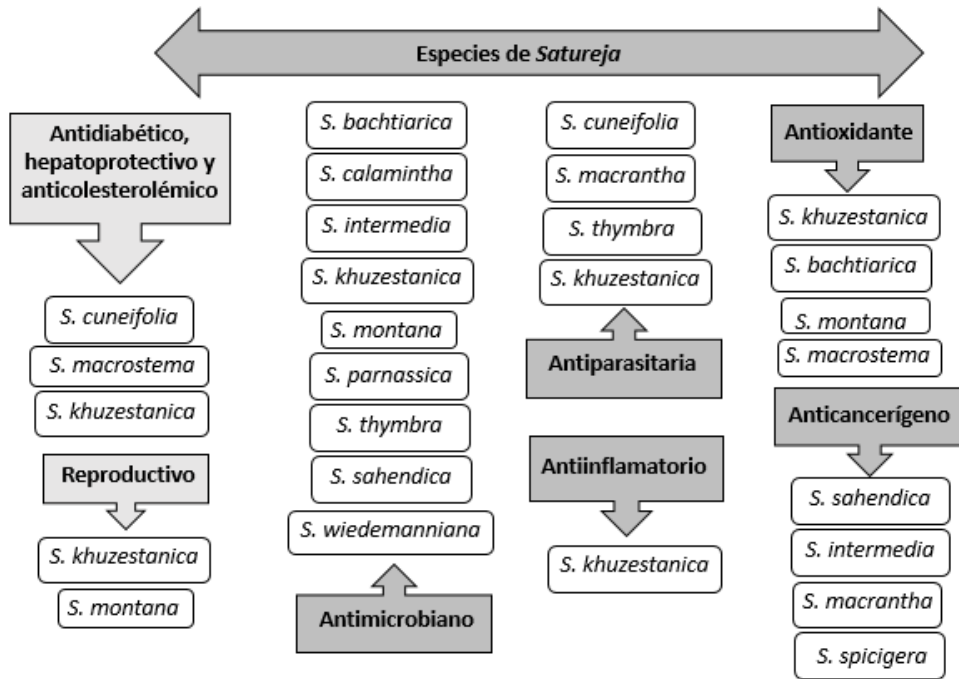


Figura 1. Especies de *Satureja* y sus actividades biológicas (Basado en Jafari *et al.*, 2016).

Dentro de este género se encuentra *S. macrostema* (SM) (sinónimos: *Clinopodium macrostemum* y *Calamintha macrostema*), el cual es un recurso forestal no maderable (RFNM) tipo arbustivo con olor a menta que crece en climas templados con vegetación de encino (*Quercus*), pino (*Pinus*) y oyamel (*Abies religiosa*) (Figura 2).



Figura 2. Colecta de *Satureja macrostema*, Diciembre 2015 (Santa María Lachixío, Zimatlán Oaxaca).

Se distribuye en zonas montañosas y boscosas al occidente del país, abarcando los estados de Oaxaca, Guerrero, Colima, Jalisco, Michoacán y el eje neovolcánico del Estado de

México, Puebla y Morelos. Los purépechas lo conocen como nurhitini o nurite; los zapotecos le llaman hierba o rosa de borracho, poleo, guiezza y quieutzú; los nahuas le nombran cuencuenzpatli. También se le conoce como toche, garañona, té de monte, atóchietl, tragorigano, quauhnhuacense, toronjil, tunché y tarepe. Tiene usos medicinales (controlar malestares estomacales y la resaca producto del consumo excesivo de bebidas alcohólicas), alimenticios (en forma de té, agua de tiempo, condimento o quelite), rituales y ornamentales, por ejemplo, se reparte en forma de pequeños manojos y se utiliza para adornar edificios en bodas, fiestas patronales, día de muertos y año nuevo. Todo esto hace al poleo de “interés social y económico” (Ortega-Ortega & Vázquez-García, 2014).

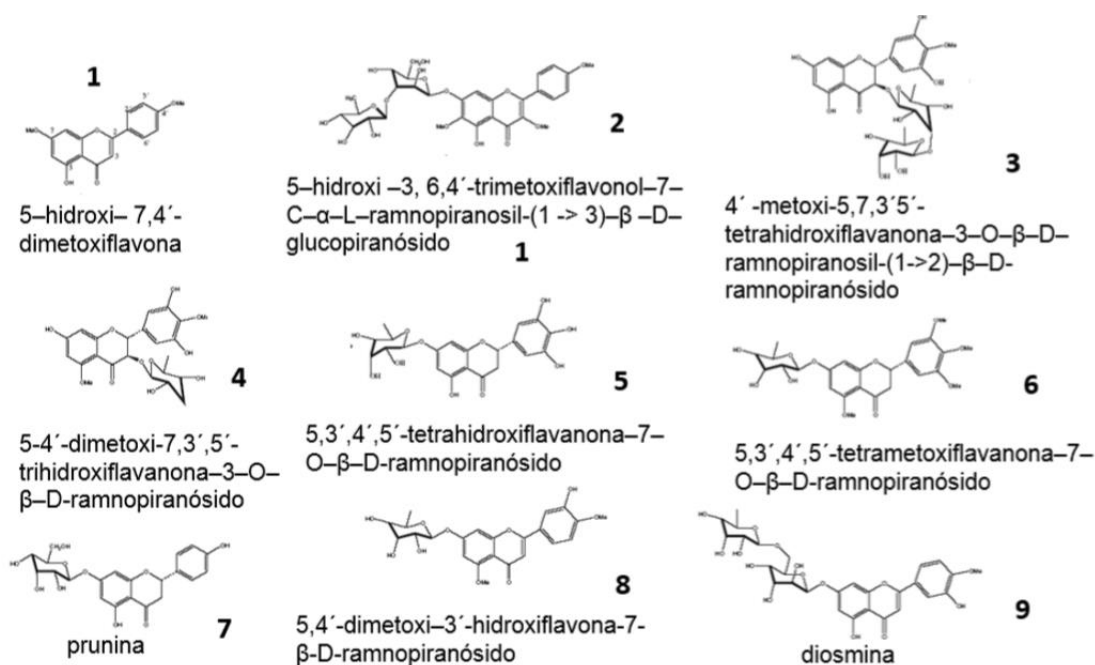



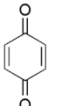
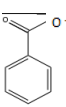
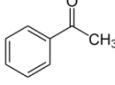
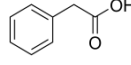
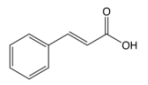
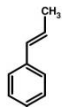
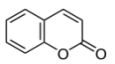
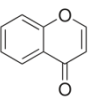
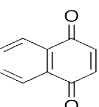
Figura 3. Estructuras químicas de compuestos aislados de *Satureja macrostema* (Gutiérrez, 2013).

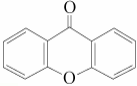
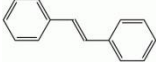
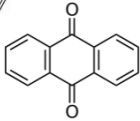
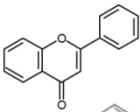
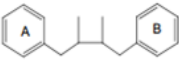
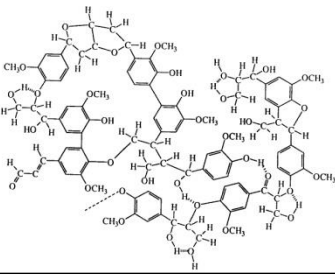
Previos estudios han demostrado que extractos alcohólicos de SM son capaces de estabilizar el radical DPPH (Villa-Ruano *et al.*, 2013; Gutiérrez & Navarro, 2010). Se evaluó el efecto de la inhibición de la contracción espontánea de yeyuno de conejo de extractos con diferente polaridad, siendo el extracto clorofórmico el de efecto significativamente mayor (Arroyo *et al.*, 2004). Gutiérrez & Navarro (2010) determinaron la actividad antioxidante y hepatoprotectora de extracto metanólico. Gutiérrez *et al.* (2010) mostraron que extracto metanólico de SM exhibió significativa actividad inhibitoria contra productos de glicación

avanzada (AGEs). De acuerdo a Gutiérrez (2013), extractos metanólicos de SM contiene compuestos fenólicos como flavonoides (Figura 3) que han sido relacionados con la actividad antioxidante, hepatoprotector y nefroprotectivo. Por otra parte Villa-Ruano *et al.*, 2015 mostraron que el aceite esencial presenta actividad antilipasa, anti- α -glucosidasa, antiacetilcolinesterasa, así como la inhibición de crecimiento de ciertas bacterias y hongos. Estas actividades son atribuidas a la presencia de compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos son esenciales para la fisiología y metabolismo celular. Están implicados en muchas funciones en las plantas, tales como propiedades sensoriales (color, aroma, sabor y astringencia), estructura, polinización, resistencia a plagas y depredadores, proceso germinativo de semilla después de la cosecha y el crecimiento, así como el desarrollo y la reproducción, entre otros. Los compuestos fenólicos pueden ser clasificados de diferentes maneras porque están constituidos de un gran número de estructuras heterogéneas que van desde moléculas simples a compuestos altamente polimerizados. De acuerdo a su cadena de carbono, los compuestos fenólicos se pueden dividir en 16 clases principales (Tabla 1).




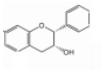
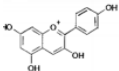

Tabla 1. Clases de compuestos fenólicos en plantas de acuerdo a su cadena de carbono (Basado en Giada, 2013).

Clase	Esqueleto básico	Estructura básica
Fenoles simples	C ₆	
Benzoquinonas	C ₆	
Ácidos fenólicos	C ₆ -C ₁	
Acetofenonas	C ₆ -C ₂	
Acidos fenilacéticos	C ₆ -C ₂	
Ácidos hidroxicinámicos	C ₆ -C ₃	
Fenilpropanoides	C ₆ -C ₃	
Cumarinas, isocumarinas	C ₆ -C ₃	
Cromona	C ₆ -C ₃	
		

Naftoquinonas	C_6-C_4	
Xantonas	$C_6-C_1-C_6$	
Estilbenos	$C_6-C_2-C_6$	
Antraquinonas	$C_6-C_2-C_6$	
Flavonoides	$C_6-C_3-C_6$	
Lignanós y neolignanós	$(C_6-C_3)_2$	
Ligninas	$(C_6-C_3)_n$	

Por otra parte, de acuerdo a su distribución en la naturaleza, los compuestos fenólicos se pueden dividir en tres clases: poco distribuidas (como fenoles simples, pirocatecol, hidroquinona, resorcinol, aldehídos derivados de ácidos benzoicos que son componentes de aceites esenciales, tales como vainillina), ampliamente distribuidas (divididas en flavonoides (Tabla 2) y sus derivados, cumarinas y ácidos fenólicos, tales como ácido benzoico y cinámico y sus derivados) y polímeros (taninos y lignina). Por último, en cuanto a la ubicación en la planta (libre en la fracción soluble de la célula o ligada a los compuestos de la pared celular), junto con la estructura química de estas sustancias, los compuestos fenólicos también pueden clasificarse como: soluble (tal como fenoles simples, flavonoides y taninos de bajo y mediano peso molecular no unidos a compuestos de membranas) e insolubles (esencialmente constituidos por taninos condensados, ácidos fenólicos y otros compuestos de bajo peso molecular unidos a polisacáridos de pared celular o proteínas formando complejos insolubles estables) (Giada, 2013).

Tabla 2. Estructuras químicas de las principales clases de flavonoides.

Flavonoide	Estructura básica
Flavonas	
Flavonoles	
Flavanonas	
Flavanoles	
Anticianidinas	
Isoflavonas	

Los polifenoles presentes en materiales vegetales presentan un amplio rango de compuestos que van de polares a no polares y demuestran una amplia variedad de actividades biológicas *in vitro* e *in vivo*. Además la bioactividad de compuestos fenólicos depende de factores como el método de extracción, tamaño de partícula de la muestra, tipo de disolvente, tiempo y temperatura de extracción. Por esta razón es muy importante seleccionar la apropiada combinación de estos factores para mejorar la extracción y funcionalidad de compuestos polifenólicos (Sharmila *et al.*, 2016; Dragović-Uzelac *et al.*, 2012; García-Márquez *et al.*, 2012). El Capítulo I aborda los métodos de extracción de fenólicos que existen y los empleados en este trabajo.

Los extractos de plantas ofrecen aplicaciones potenciales como aditivos naturales de bajo costo para mejorar la calidad y vida de anaquel de alimentos sin el uso de aditivos sintéticos como BHA y BHT, de los cuales su uso ha sido restringido en alimentos por su toxicidad. Sin embargo, la formulación de un producto con atributos benéficos de los ingredientes bioactivos es un desafío debido a varias razones como pobre solubilidad en agua y baja biodisponibilidad de sustancias bioactivas, los cuales pueden impedir su efectiva liberación transdérmica (Sulaiman *et al.*, 2016). Los constituyentes de extractos son especialmente propensos a daño oxidativo, transformaciones químicas o reacciones de polimerización (Figura 4). Por último muchas de estas moléculas poseen un sabor muy astringente y amargo, que limita su uso en alimentos o en medicamentos orales. Para evitar estos inconvenientes,

se han desarrollado sistemas de liberación, y entre ellos, la encapsulación parece ser un enfoque prometedor (Munin & Edwards-Lévy, 2011).

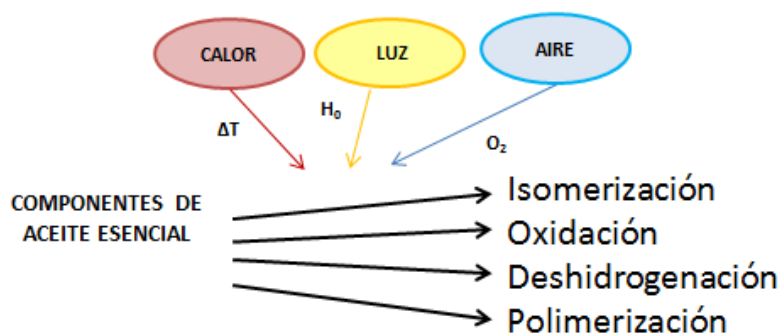


Figura 4. Posibles reacciones de conversión en aceites esenciales (Turek *et al.* 2013).

La encapsulación de compuestos bioactivos dentro de sistemas de liberación pueden ser fácilmente incorporados en alimentos, y en recientes años, han atraído la atención tanto de científicos como de la industria. La nanotecnología significativamente ha contribuido al desarrollo de sistemas de liberación, capaces de encapsular compuestos bioactivos como antioxidantes, protegerlos de reacciones indeseables, minimizar las propiedades organolépticas del producto, así como aumentar actividad por promoción de velocidad de transferencia de masa en sitios de acción (Donsi *et al.*, 2010). Dentro de las técnicas utilizadas para este fin se encuentran las nanoemulsiones (ver Capítulo III) que son uno de los sistemas dispersos más eficientes, y son caracterizados por presentar diámetros de gota del orden del submicrón (Patel & Joshi, 2012). Las nanoemulsiones presentan una gran variedad de ventaja respecto a las emulsiones micrométricas, no sólo en la simple apariencia (las primeras permiten el paso de la luz, mientras que las últimas son opacas), sino además permiten incrementar y homogenizar la velocidad de absorción de los compuestos encapsulados, ayuda a solubilizar compuestos no polares permitiendo obtener una dosificación soluble en agua, incrementando la biodisponibilidad de los compuestos activos, y debido a su tamaño es posible aplicarlo por diferentes vías, tópica, oral, intravenosa, como un producto de liberación controlada (Kumar & Singh, 2012), además de que se ha encontrado que este tipo de sistemas es capaz de conservar las propiedades funcionales de compuestos bioactivos (Hernández- Jaimes, *et al.*, 2013).

HIPÓTESIS GENERAL

Mediante el uso de tecnologías emergentes, solas o combinadas, como el uso de fluidos supercríticos y/o microondas-ultrasonido, es posible mejorar el rendimiento de extracción de compuestos bioactivos presentes en *Satureja macrostema* comparado con técnicas convencionales como la extracción por disolventes; así mismo, la incorporación de dichos compuestos funcionales en nanoemulsiones permitirá protegerlos y brindarles estabilidad contra su degradación por agentes ambientales, obteniendo sistemas altamente funcionales de liberación controlada.

OBJETIVO GENERAL

Obtener sistemas funcionales de liberación controlada a partir de extractos hidro y lipofílicos de *S. macrostema*, obtenidos a partir de tecnologías de microondas-ultrasonido y fluidos supercríticos comparados con sus respectivos métodos convencionales, a través de su incorporación en nanoemulsiones de tipo W/O y O/W.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar las condiciones de extracción de compuestos bioactivos de *S. macrostema*, mediante la extracción por reflujo (RE) y microondas-ultrasonido (MUAE), identificar los compuestos principales y determinar la actividad funcional.
2. Determinar las condiciones de extracción de aceite esencial de hojas *S. macrostema*, mediante la extracción por hidrodestilación (HD) y fluidos supercríticos (SFE), identificación de compuestos principales y determinación de actividad funcional.
3. Determinar las condiciones para la formación de nanoemulsiones de tipo W/O y O/W que contengan los bioactivos de *S. macrostema*.
4. Caracterizar y evaluar la estabilidad de las nanoemulsiones conteniendo los bioactivos hidro y liposolubles de *S. macrostema* bajo condiciones de estrés (temperatura y luz).

DIAGRAMA DE DESARROLLO EXPERIMENTAL

Como se ha mencionado anteriormente, el desarrollo del presente trabajo se ha dividido en tres capítulos:

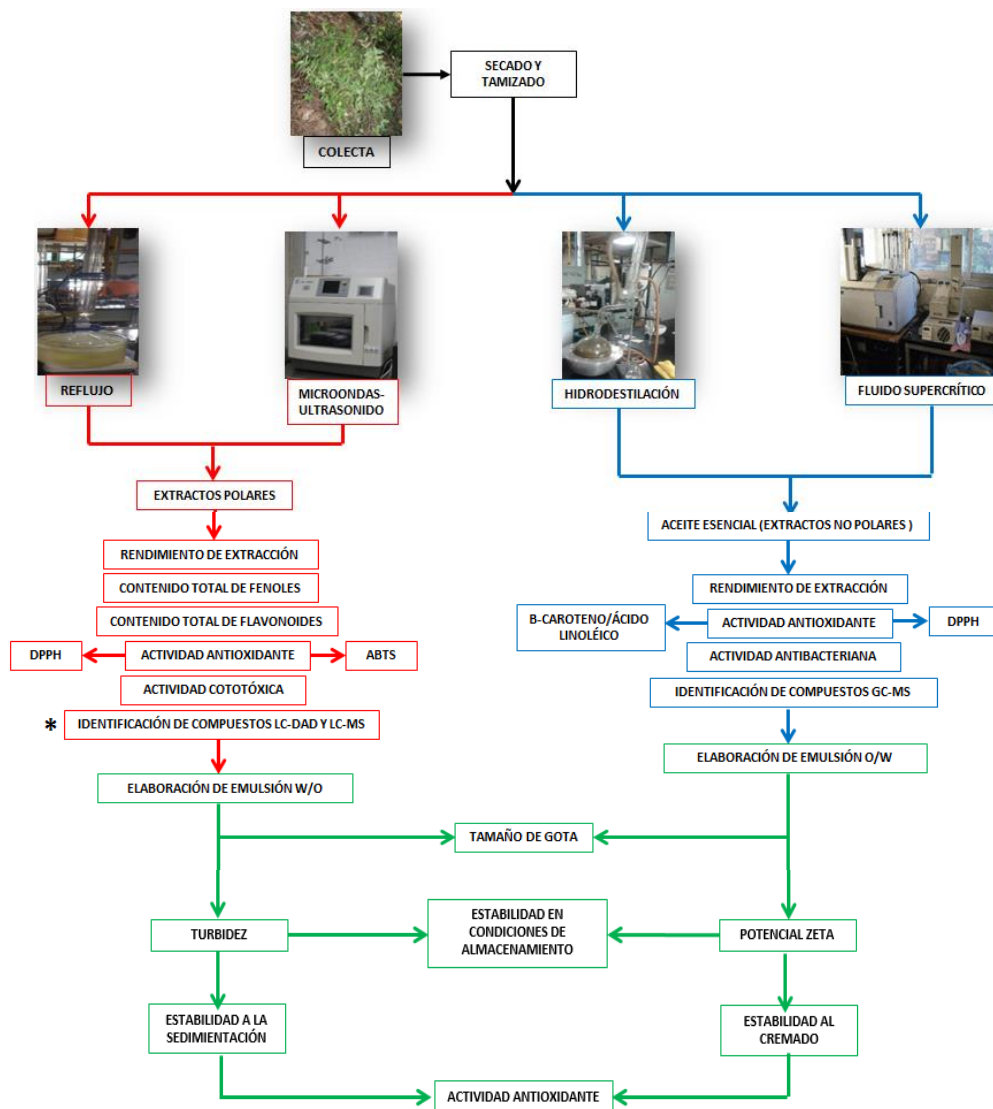


Figura 5. Estrategia general seguida para la realización de esta tesis. (*La identificación de compuestos y actividad citotóxica se realizó únicamente para el mejor extracto obtenido de cada método de extracción).

El Capítulo I conduce a la obtención y caracterización de los extractos acuosos de SM, obtenidos mediante un método convencional (RE) y uno híbrido (MUAE). La estrategia seguida para este capítulo se muestra en la Figura 5 en los recuadros de color rojo.

El Capítulo II describe la estrategia experimental realizada para la obtención y caracterización de los aceites esenciales de SM obtenidos mediante un método convencional (HD) y uno emergente (SFE), en la Figura 5 las actividades de este capítulo se presentan en los recuadros azules.

El Capítulo III corresponde a las actividades realizadas para establecer las condiciones para la obtención y caracterización de ambos extractos de SM incorporados en nanoemulsiones simples (W/O y O/W), estas actividades se presentan en la Figura 5 en los recuadros verdes.

Finalmente, en el Anexo se muestra la publicación del artículo derivado de las actividades realizadas en esta tesis.

CAPÍTULO I

EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS DE *Satureja macrostema* OBTENIDOS MEDIANTE REFLUJO Y MICROONDAS- ULTRASONIDO

1.1 Marco teórico

La preparación de la muestra vegetal y remoción de sustancias no deseadas para asegurar la cuantificación de fenólicos es importante, pero el procedimiento de extracción es el principal determinante para la separación y extracción de fenólicos. La extracción es generalmente influenciada por la naturaleza de la muestra, tamaño de partícula, tipo de disolvente así como las técnicas de extracción empleadas (Khoddami *et al.*, 2013). La eficiencia del proceso de extracción y masa de compuestos liberados depende del grado de desintegración de la célula vegetal, el cual ha sido logrado previamente por extracción convencional sólido-líquido, con asistencia de procesos como calentamiento, ebullición, presión, mezclado y maceración (Vian *et al.*, 2009). Las técnicas de extracción más comúnmente usadas incluyen técnicas convencionales como maceración, percolación, infusión, decocción, extracción de calentamiento continuo, etc. (Dhanani *et al.*, 2013). Los métodos de extracción con soxhlet y reflujo son normalmente desarrollados a 90°C por varias horas, mientras que la maceración es desarrollado por varios días a temperatura ambiente (Khoddami *et al.*, 2013). El uso de estos métodos tradicionales no solo resultan en degradación de diferentes fenólicos debido a la intensiva disrupción mecánica, sino que largos tiempos de extracción, severas condiciones de calentamiento y uso extensivo de disolventes orgánicos tóxicos favorece la liberación de enzimas oxidativas y promueve estas reacciones de degradación (Vian *et al.*, 2009). Debido a problemas asociados con extracciones convencionales una demanda por alternativas de técnicas de extracción de compuestos fenólicos ha ido en aumento. Algunas de ellas se muestran en la Figura 1.1.

Una de estas alternativas es la extracción asistida por ultrasonido (UAE), el cual es particularmente atractivo por su simplicidad y bajo costo del equipo. Está basado en el uso de energía derivada de ultrasonido (ondas de sonido con frecuencias por encima de 20 kHz) facilitando la extracción de analitos de muestras sólidas por el disolvente, el cual es seleccionado dependiendo de la naturaleza de los solutos a ser extraídos (Soni *et al.*, 2010). Esta técnica ha sido usada para la extracción de compuestos de plantas para reducir el tiempo de extracción, disminuir el consumo de disolvente, incrementar el rendimiento de extracción y mejorar la calidad de los extractos (Wang & Weller, 2006). La sonicación es la producción

de ondas de sonido que crean burbujas de cavitación cerca del tejido de la muestra, las cuales rompen las paredes celulares, por tanto liberan el contenido celular. Un apropiado disolvente es mezclado con una muestra y sonicado bajo temperatura controlada por tiempo específico (Khoddami *et al.*, 2013). La recuperación de extracto es influenciado no solo por el tiempo de sonicación, temperatura y selección del disolvente sino también por la frecuencia de ondas y distribución de ondas de ultrasonido (Wang & Weller, 2006; Azmir *et al.*, 2013). El ultrasonido ha sido usado tanto en modo estático como dinámico para extraer compuestos fenólicos de plantas (Kivilompolo & Hyotylainen 2009).

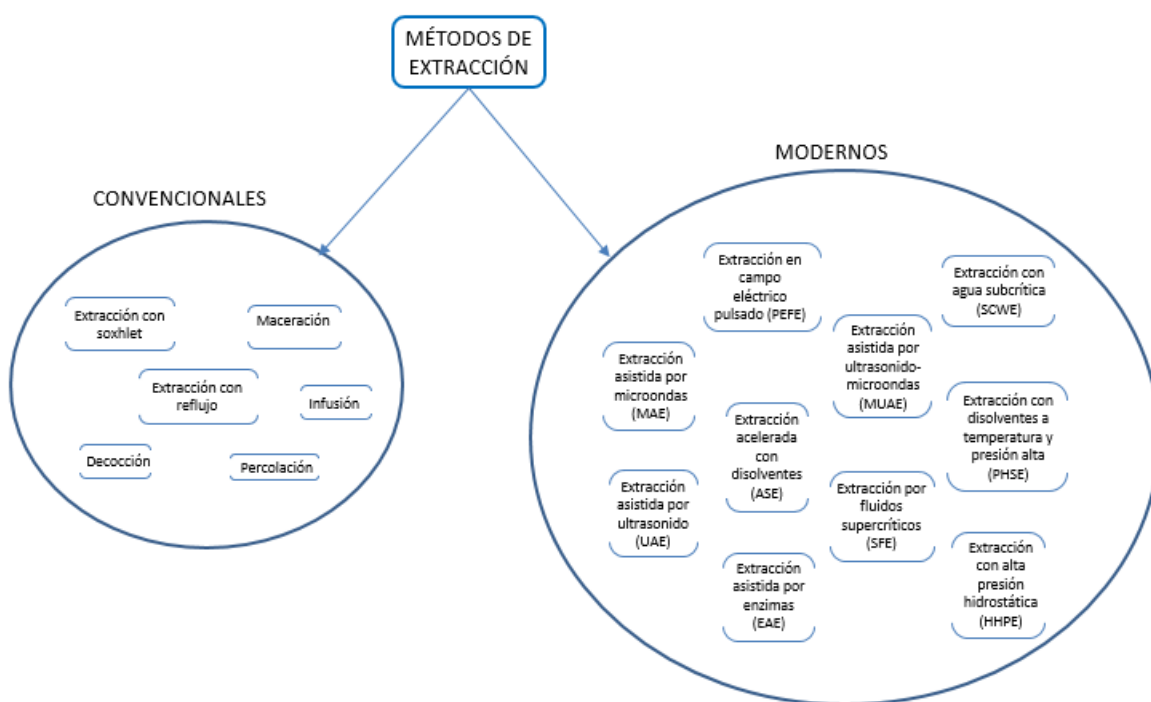


Figura 1.1. Métodos de extracción de compuestos fenólicos.

Otra técnica no convencional es la extracción asistido por microondas (MAE). Las microondas son campos electromagnéticos en un rango de frecuencia de 300 MHz a 300 GHz (Azmir *et al.*, 2013). Las microondas inducen movimiento molecular en materiales o disolventes con dipolos, resultando en un calentamiento de la muestra (Camel, 2001). El calentamiento causa que la células de las plantas pierdan humedad a través de la evaporación; el vapor genera aumentos y eventuales rupturas de las células, liberando sus compuestos bioactivos (Wang & Weller, 2006). Los disolventes polares tienen una mayor constante

dieléctrica que los disolventes no polares y pueden absorber más energía de microondas, el cual puede resultar en un mayor rendimiento de fenólicos (Khoddami *et al.*, 2013). Los polifenoles son dipolos que pueden absorber energía de microondas debido a sus grupos hidroxilo, por lo que MAE es una técnica que puede ser usada para la extracción de estos compuestos (Ajila *et al.*, 2011).

La unión de dos técnicas de poderosa radiación (microondas y ultrasonido) es una nueva propuesta eficiente para extraer compuestos bioactivos. Como se mencionó anteriormente MAE es una simple y rápida técnica usando mecanismos dieléctricos para calentar muestras y extraer compuestos bioactivos de plantas (Huie, 2002), mientras que UAE forma cavitaciones, el cual incrementa la transferencia de masa y mejora la penetración del disolvente dentro de la muestra (Jiao & Zuo, 2009). Así que, la extracción asistida por microondas-ultrasonido (MUAE) es una poderosa técnica que puede reducir el tiempo de extracción, usar bajos volúmenes de disolventes que resultan en mayores rendimientos de extracción que extracción convencional, MAE y UAE (Rostagno *et al.*, 2010).

Debido a que la actividad antioxidante de extractos naturales ha sido encontrada que depende de los componentes activos de la materia prima, la polaridad del disolvente y el tipo de extracción, en este capítulo se enfocará en el objetivo 1 de esta tesis.

1.2 Materiales y métodos

1.2.1 Material vegetal

La planta fue colectada durante el mes de Octubre del 2013 en San Pedro el Alto (16° 47' 51.71" N; 97° 2' 24.8" W) municipio de Zimatlán de Álvarez, Oaxaca. Las hojas fueron desprendidas y secadas bajo sombra durante 1 semana. Posteriormente fueron molidas y tamizadas usando una malla 16 (1.19mm), luego fueron almacenadas a temperatura ambiente en bolsas de plástico negro hasta su uso.

1.2.2 Reactivos

NaCl, Na₂CO₃, NaNO₂, AlCl₃, NaOH, 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH), Acido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6- sulfonico) (ABTS), persulfato de sodio (Na₂S₂O₈.)

NH₄Cl, KHCO₃, EDTA tetrasódico, MTT, RN, estándares (ácido gálico, catequina, ácido rosmarínico, ácido clorogénico, hesperidina, naringina, ácido cafeico, ácido cumárico), Folin-Ciocalteu, medio Mc Coy's 5a, heparina, buffer fosfato salino (PBS), fitohemaglutinina, solución de penicilina-streptomina, etanol (E), acetonitrilo, ácido fórmico, dimetilsulfóxido (DMSO), ácido acético, isopropanol, agua destilada y desionizada.

1.2.3 Extracción de bioactivos de SM

Para las extracciones, se usaron 3 g de material vegetal en 90 mL del disolvente de extracción (Etanol al 100, 75,50 y 0% v/v). Los extractos obtenidos por RE y MUAE fueron enfriados a temperatura ambiente (25°C), filtrados a través de papel Whatman No. 2 y membranas de nylon de 0.45 µm. Los extractos filtrados se almacenaron en refrigeración en frasco ámbar hasta su posterior caracterización. Los extractos fueron etiquetados como la combinación de la concentración etanólica y el tiempo de extracción para cada técnica de extracción, por ejemplo E100-30 min para el extracto obtenido con etanol absoluto durante 30 min.

1.2.3.1 Extracción por reflujo (RE)

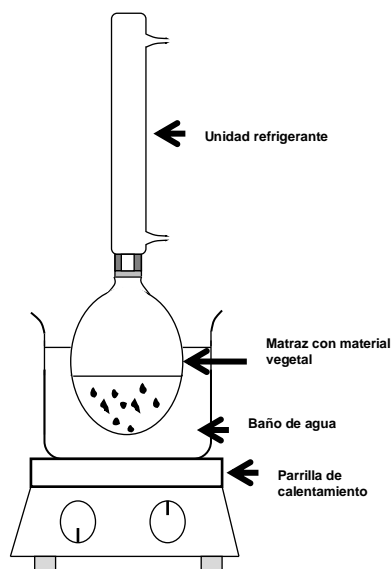


Figura 1.2. Esquematzación del sistema de extracción por reflujo (RE).

Para RE, el material vegetal y el disolvente de extracción apropiado fueron adicionados a un matraz de fondo plano y calentados hasta que los disolventes (E100, E75, E50, E0) alcanzaron su punto de ebullición y se mantuvo esa condición bajo reflujo (Figura 1.2) durante 30, 60 ó 120min.

1.2.3.2 Extracción por microondas-ultrasonido (MUAE)

Para MUAE, fue usado un sistema de extracción/reacción CW-2000 A (potencia máxima de microondas de 800 W a una frecuencia de 2,450 MHz y un transductor ultrasónico con una potencia de 50 W a una frecuencia de 40 kHz), para la extracción de compuestos polifenólicos de SM. Las cantidades necesarias de material vegetal apropiado y disolvente fueron transferidos a un matraz, el cual fue colocado dentro de la cámara del equipo y ensamblado con el tubo del condensador (Figura 1.3). Las variables de extracción usadas fueron el tiempo de extracción (30, 60, y 120 min) y el disolvente (E100, E75, E50, E0). La potencia y temperatura establecidas fueron 500 W y 40°C, de acuerdo con experimentos preliminares (datos no mostrados). Cuando la extracción fue completada, el matraz fue removido del equipo, y el extracto fue filtrado y almacenado de acuerdo a lo mencionado anteriormente en la sección 2.2.

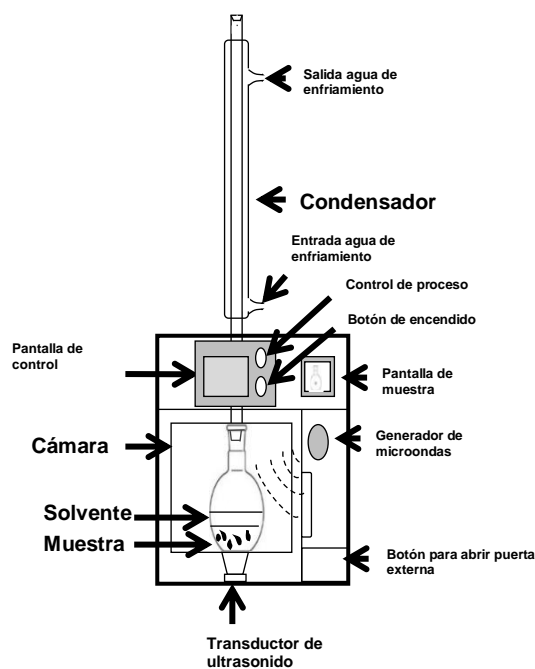


Figura 1.3. Esquematización del sistema de extracción mediante Microondas-Ultrasonido.

1.2.4 Caracterización de extractos

1.2.4.1 Rendimiento de extracción

Para determinar el contenido de sólidos solubles totales (SST) de los extractos, una alícuota de 5 mL de extracto crudo fue secado en una estufa a 50°C durante 12 h hasta alcanzar peso constante. Este procedimiento fue realizado para todos los tratamientos. El rendimiento fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación y expresado como g de SST por cada 100g de hojas secas.

$$\text{Rendimiento de extracción} = \left(\frac{\text{g de SST del extracto}}{\text{g de hojas secas inicial}} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

1.2.4.2 Contenido de fenoles totales (TPC)

Un mililitro de extracto se colocó en un tubo de ensaye y se le adicionaron 0.25 mL de reactivo Folin-Ciocalteu, seguido de la adición de 0.25 mL de una solución de carbonato de sodio (20%, p/v) y 2.5 mL de agua destilada. La mezcla se agitó en un vortex y se dejó reposar por 60 min en oscuridad. La absorbancia de la muestra se determinó a 765 nm en un espectrómetro GENESYS 2. La concentración de fenoles totales fue calculada usando una curva tipo de ácido gálico, y los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto seco (Wu *et al.*, 2013).

1.2.4.3 Contenido de flavonoides totales (TFC)

250 µL de extracto de SM fueron adicionados con 1 mL de agua destilada, 750 µL de una solución de nitrito de sodio (5%, p/v), y la mezcla se dejó reaccionar durante 6 min. Posteriormente se agregaron 150 µL de una solución de cloruro de aluminio (10%, p/v) y se dejó reaccionar por 5 min, después se agregaron 500 µL de hidróxido de sodio (1M) y 525 µL de agua destilada e inmediatamente se leyó la absorbancia a 510 nm. El contenido de flavonoides totales se calculó usando una curva tipo de catequina y los resultados fueron expresados como mg equivalentes de catequina/g de extracto seco (Meyers *et al.*, 2003; Bahramikia *et al.*, 2008).

1.2.4.4 Actividad antioxidante mediante ensayo DPPH•

El ensayo se llevó a cabo de acuerdo a la metodología reportada por Muanda *et al.* (2010) y Wu *et al.* (2013). Una alícuota de 1 mL de extracto crudo a diferentes concentraciones fue mezclado con 1 mL de solución metanólica de DPPH (0.1 mM), la mezcla fue agitada en un vórtex y se dejó reposar durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad y se leyó la absorbancia a 517 nm. Se calculó el porcentaje de inhibición mediante la siguiente ecuación y se expresó como IC₅₀ (concentración en µg_{SST}/mL de extracto requerido para inhibir el 50% del radical):

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(\text{Abs control} - \text{Abs muestra})}{\text{Abs control}} \times 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Los resultados fueron expresados como la concentración inhibitoria del radical al 50% en µg/mL (IC₅₀).

1.2.4.5 Actividad antioxidante mediante ensayo ABTS^{•+}

La actividad inhibidora del radical catión ABTS^{•+} sobre los extractos en estudio se midió de acuerdo con el método descrito por Re *et al.* (1999). El radical catión ABTS^{•+} fue producida por la reacción de solución stock de ABTS 7 mM con persulfato de sodio 2.45 mM en concentración final y guardada en oscuridad a temperatura ambiente por 12-16 h antes de su uso. La solución de ABTS^{•+} fue diluida con etanol a una absorbancia de 0.7± 0.02 a 734 nm. Posteriormente, 10 µL de varias concentraciones de extracto crudo fueron mezcladas con 1,000 µL de ABTS diluido. La mezcla se dejó reaccionar durante 6 minutos y se midió la absorbancia a 734 nm. Se calculó el porcentaje de inhibición mediante la ecuación 2 y se expresó como IC₅₀ (concentración en µg_{SST}/mL de extracto requerido para inhibir el 50% del radical).

1.2.4.6 Perfil cromatográfico mediante LC-DAD

La composición de los extractos fue determinado de acuerdo a Vladimir-Knežević *et al.* (2014). El análisis mediante HPLC fue realizado en un instrumento Agilent 1100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). La separación se realizó en una columna Kromasil

C18 5 u 100A (4.6 × 250 mm) y la fase móvil consistió de acetonitrilo acidificado (5% de ácido fórmico en acetonitrilo; disolvente A) y agua acidificado (5% de ácido fórmico en agua; disolvente B). El gradiente empleado fue el siguiente: 0 min, 15% A; 25 min, 35% A; 27 min, 70% A; 32 min, 70% A; 33 min, 100% A; 38 min, 100% A. La velocidad de flujo fue mantenido constante a 0.9 mL/min y el volumen de inyección fue de 20µL. Todas las pruebas cromatográficas se realizaron a 20°C a una longitud de 330 nm. Los compuestos fueron identificados de acuerdo al tiempo de retención de estándares. Los resultados fueron expresados en µg/g_{SST} de acuerdo a curvas de calibración preparados con estándares correspondientes. El análisis de los extractos se realizó por triplicado.

1.2.4.7 Identificación de compuestos mediante LC-MS

El análisis fue desarrollado en un equipo Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 (Figura 1.4) acoplado a un espectrómetro de masas ESI (MicroTOF II; Bruker). El sistema de ionización fue operado en modo negativo. Los compuestos fueron separados usando una columna fase reversa Thermo Scientific Acclaim 120 C18 (3 × 100 mm, 3 µm) operado a 40°C con un flujo de elución de 0.3 mL/min. Las fases móviles fueron: (A) ácido fórmico 0.1% (v/v) en agua y (B) ácido fórmico 0.1% (v/v) en acetonitrilo. El gradiente usado fue: 0-10 min, 92-85% A; 10-60 min, 85-60% A; 60-65 min 60-20% A; 65-70 min 20%A. Los parámetros de ESI fueron: voltaje de capilaridad de 3000V; end-plate offset, -500 V; rango de escaneo de 50-3000 m/z; flujo de nitrógeno de 10.0/min; temperatura del gas de 210°C; y nebulización de la presión de gas de 3.0 Bar.

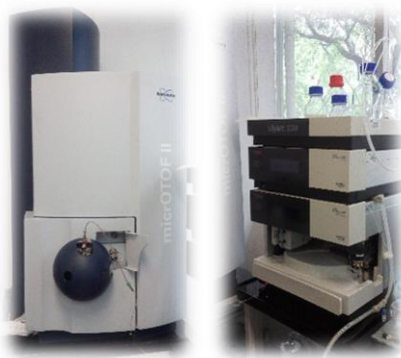


Figura 1.4. Cromatógrafo de líquidos Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 acoplado a un espectrómetro de masas ESI (MicroTOF II).

1.2.4.8 Citotoxicidad

El efecto citotóxico de los extractos de SM fue evaluado en linfocitos de sangre periférica humana mediante el ensayo de Bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio (MTT) y rojo neutro (RN). La sangre fue obtenida de 6 donadores adultos (3 masculinos y 3 femeninos) con una edad promedio de 27 años. Dos controles y cuatro experimentales por triplicado fueron usados para cada muestra de donador: (I) control negativo (células no tratadas), (II) control vehículo (0.5% DMSO), 2 experimentales para RE (III, IV) y 2 experimentales para MUAE (V, VI). Para los experimentales, extractos liofilizados de RE y MUAE fueron resuspendidos en DMSO (0.5% concentración final) para obtener concentraciones finales de 0.1 y 1 mg_{SS7}/mL y se filtraron con filtros de jeringa de 0.45 µm. El control negativo fue considerado como una viabilidad celular de 100%.

1.2.4.8.1 Cultivo de linfocitos

Los cultivos fueron preparados colocando 0.5 mL de sangre en tubos de plástico (NUNC) conteniendo 2.5 mL de medio suplementado (100 mL de medio Mc Coy's 5^a adicionado con 1 mL de heparina, 4 mL de fitohemaglutinina y 0.4 mL de solución de penicilina-streptomicina (5000 U/ug/mL en solución de NaCl a 0.85%). Los cultivos fueron incubados a 37°C durante 24 horas. Después del tiempo de incubación, se procedió a exponer los grupo de tubos II-VI con 0.3 mL de DMSO 5% y 0.3 mL de los respectivos extractos. Todos los tubos fueron incubados nuevamente a 37°C durante 48 horas. Posteriormente cada grupo (I-VI) fue subdividido en dos tubos, el cual uno se utilizó para la prueba de MTT y el otro para el ensayo RN.

1.2.4.8.2 Aislamiento de linfocitos

Se utilizó la metodología descrita por Varalakshmi *et al.* (2011) con algunas modificaciones. 5 mL de PBS fue adicionado a cada tubo, se homogenizó delicadamente y se centrifuge a 1,500 rpm durante 10 min. Con cuidado se recolectaron 75 µL de linfocitos y se introdujeron en nuevos tubos y resuspendidos en 5 mL buffer de lisis (solución diluida 1:10 de 89.9 g NH₄Cl, 10.0 g de KHCO₃ y 370.0 mg de EDTA tetrasodio por cada litro de agua desionizada y ajustada a pH 7.3). Se incubaron en oscuridad durante 15 min y posteriormente centrifugados a 2,000 rpm por 10 min. El sobrenadante fue cuidadosamente

removido de manera que el botón de linfocitos permaneciera en el fondo del tubo. Posteriormente, a los tubos se les agregó 4 mL de solución hipotónica (KCl 0.04%) y se incubaron a 37°C durante 10 min. Se centrifugaron nuevamente y el sobrenadante fue removido de manera que el botón de linfocitos permaneciera en el fondo del tubo.

1.2.4.8.3 Ensayo rojo neutro

El ensayo fue determinado de acuerdo a Repetto *et al.* (2008) con algunas modificaciones. Se preparó una solución stock de RN disolviendo 0.005 g de colorante RN en 1.25 mL de PBS. En un tubo Eppendorf se disolvió 20 µL de RN stock en 1 mL de medio Mc Coy's 5ª; de esta solución se tomaron 100 µL y fueron adicionados a los tubos con botones de linfocitos, posteriormente se incubaron durante 2 h a 37°C. Los tubos fueron centrifugados (3,000 rpm por 10 min) y el sobrenadante fue removido con cuidado de manera que el botón de linfocitos permaneciera en el fondo del tubo, se realizó un lavado con 150 µL de PBS y después centrifugados a 3,000 rpm por 10 min. Nuevamente el sobrenadante fue removido con cuidado, se adicionaron 100 µL de solución desteñidora (1,250 µL de agua desionizada, 1,250 µL de alcohol y 25 µL de ácido acético glaciar) se incubaron a 37°C durante 10 minutos y se leyó la absorbancia a 492 nm en un lector de microplacas. La viabilidad celular fue calculada de acuerdo a la ecuación 3:

$$Viabilidad\ celular\ (\%) = \frac{Absorbancia\ promedio\ de\ células\ tratadas}{Absorbancia\ promedio\ de\ las\ células\ control} \times 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

1.2.4.8.4 Ensayo MTT

El ensayo fue determinado de acuerdo a Mosmann (1983). 50 µL de solución de MTT (1 mg/mL in PBS) fue adicionado a cada tubo conteniendo linfocitos, se incubaron a 37°C durante 2 h y 75 µL de isopropanol fueron adicionados. Se incubaron a 37°C durante 10 minutos y se leyó la absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas. La viabilidad celular fue calculada de acuerdo a la ecuación 3.

1.2.5 Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado y los resultados fueron expresados como promedio ± DE. Los datos de TPC, TFC, actividad antioxidante y

citotoxicidad fueron comparados usando la prueba TUKEY y ANOVA. Una prueba de correlación de Pearson fue desarrollado con el objetivo de establecer efectos entre las variables: rendimiento (SST), TPC, TFC y actividad antioxidante mediante ensayo ABTS y DPPH. Los niveles de significancia fueron definidos a $p < 0.05$ y $p < 0.01$. Todos los análisis fueron desarrollados usando el software SPSS Statistics 17.0 (IBM Corporation, NY, USA).

1.3. Resultados y discusiones

1.3.1 Rendimiento

Los extractos de SM fueron obtenidos usando diferentes concentraciones de etanol en agua. El rendimiento de extracción en términos de SST, TPC y TFC obtenidos por ambas técnicas, fueron comparados considerando la composición del disolvente y tiempo de extracción como se puede observar en la Tabla 1.1. Con respecto al rendimiento, los extractos E75 por RE fueron los mejores y no hubo diferencia significativa con respecto al tiempo de extracción (Tuckey, $p < 0.05$). Mientras que los extractos MUAE resultaron con mayor rendimiento con E50_{30 min} y E50_{120 min}. En ambos casos el tiempo de extracción no afectó el contenido de SST. Por el contrario, los extractos obtenidos con E100 mostraron tener los rendimientos más bajos en ambas técnicas. El rendimiento de SST de extractos RE fue afectado por el tiempo de extracción, obteniéndose los valores más altos a 120 min. Esto no fue observado en los extractos MUAE ya que no hubo diferencias significativas.

Tabla 1.1. Comparación del rendimiento de extracción, contenido de fenoles y flavonoides totales correspondiente a cada técnica de extracción.

Disolvente	Tiempo (min)	Rendimiento (gSST/100g hoja seca)	TPC (mg_{GAE}/g_{extracto seco})	TFC (mg_{CatE}/g_{extracto seco})
EXTRACTOS OBTENIDOS POR REFLUJO (RE)				
E0	30	0.96±0.00 ^d	112.19±1.22 ^e	62.31±2.04 ^{d,e}
E0	60	1.02±0.00 ^{c,d}	102.74±2.44 ^f	68.03±0.54 ^d
E0	120	1.09±0.01 ^c	96.91±0.48 ^g	59.76±0.76 ^{d,e}
E50	30	1.18±0.00 ^b	126.86±0.13 ^c	67.54±1.12 ^d
E50	60	1.07±0.01 ^c	141.69±1.36 ^a	66.26±0.23 ^d

E50	120	1.24±0.02 ^a	114.08±0.25 ^e	82.20±3.01 ^c
E75	30	1.23±0.01 ^a	120.52±0.57 ^d	66.87±2.18 ^d
E75	60	1.22±0.03 ^a	131.84±1.74 ^b	52.61±1.39 ^e
E75	120	1.28±0.04 ^a	120.98±1.21 ^d	71.66±1.28 ^{c,d}
E100	30	0.47±0.02 ^f	127.11±1.88 ^c	112.22±12.17 ^a
E100	60	0.51±0.00 ^f	141.61±0.84 ^a	100.51±0.69 ^{a,b}
E100	120	0.58±0.00 ^e	114.63±2.37 ^e	96.54±5.49 ^b

EXTRACTOS OBTENIDOS POR MICROONDAS-ULTRASONIDO (MUAE)

E0	30	0.87±0.00 ^D	97.28±0.16 ^I	62.49±1.20 ^G
E0	60	0.85±0.01 ^D	91.01±1.48 ^J	36.01±1.3 ^H
E0	120	0.89±0.03 ^D	104.48±0.34 ^H	30.65±0.67 ^H
E50	30	1.27±0.05 ^A	119.34±0.40 ^G	88.33±0.49 ^{C,D,E}
E50	60	1.07±0.01 ^C	142.21±1.34 ^E	78.94±1.19 ^{E,F}
E50	120	1.21±0.01 ^A	145.30±0.52 ^D	68.20±0.25 ^{F,G}
E75	30	1.08±0.00 ^C	166.09±0.12 ^A	99.16±2.18 ^{B,C}
E75	60	1.15±0.02 ^B	139.72±1.58 ^E	93.64±2.45 ^D
E75	120	1.07±0.01 ^C	132.59±1.41 ^F	82.67±1.16 ^{D,E}
E100	30	0.33±0.01 ^E	133.91±0.39 ^F	109.72±10.05 ^{A,B}
E100	60	0.33±0.00 ^E	151.75±0.26 ^C	111.01±9.44 ^{A,B}
E100	120	0.34±0.00 ^E	161.69±0.13 ^B	123.88±8.62 ^A

Promedio ± DE de experimentos por triplicado. Diferentes letras mayúsculas y minúsculas en la misma columna significa diferencia entre tratamientos (p<0.05).

1.3.2 Contenido de fenoles y flavonoides totales (TPC y TFC)

El efecto del disolvente y tiempo de extracción fue evaluado sobre TPC y TFC, debido a que estos compuestos han sido considerados como responsables de la actividad antioxidante y propiedades funcionales de extractos. Estos resultados son mostrados en la Tabla 1.1. La cantidad de TPC en extractos RE resultaron en un rango de 96.91 ± 0.48 a 141.69 ± 1.36 mgGAE/gSST. Se encontró que los rendimientos de TPC fueron los mejores con E50, E75 y E100 cuando el tiempo de extracción fue de 60 min. El tiempo de extracción de 30 min no fue suficiente para obtener el máximo rendimiento y con 120 min se observó una tendencia decreciente en los valores de TPC. En los extractos E0, el más alto valor de TPC fue logrado

con 30 min, largos tiempos de extracción condujeron a una disminución de este valor. Este comportamiento está relacionado con las diferentes temperaturas alcanzadas en la extracción con RE: E0 (92 °C), E50 (89 °C), E75 (75 °C), y E100 (74 °C). El hecho de que mayores temperaturas pueden mejorar la eficiencia de extracción de compuestos fenólicos por incremento de la solubilidad, mayores velocidades de difusión, mejor transferencia de masa, reduce la viscosidad del disolvente y tensión en la superficie (Mokrani & Madani, 2016), puede conducir a establecer que mayores temperaturas pueden producir mayores contenidos de fenólicos. Sin embargo el tiempo de exposición a altas temperaturas juega un papel importante sobre el deterioro de los fenoles. Esto puede ser debido a desventajas como degradación concurrente de compuestos fenólicos que se movilizaron inicialmente a temperaturas más bajas, la descomposición de residuos fenólicos en la matriz vegetal o incluso el aumento de la pérdida de disolvente a través de la vaporización y el aumento de las reacciones de oxidación (Dent *et al.*, 2013; Mokrani & Madani, 2016). Por otro lado los valores de TFC de extractos RE mostraron que los mejores fueron observados con E100 seguido por E50, E75 y finalmente E0. Esto puede ser debido a una mejor afinidad de flavonoides con el etanol y agua-etanol. La polaridad de los disolventes de extracción influyen en la solubilidad de los compuestos en los extractos y por lo tanto su rendimiento de extracción. Es notable que TFC es mas bajo que TPC en todos los casos. De acuerdo a Sulaiman *et al* (2011) esto es debido a que los flavonoides son considerados por ser restringidos en distribución y composición en diferentes plantas en comparación con todos los compuestos fenólicos.

Para los extractos MUAE, el TPC y TFC fueron principalmente influenciados por el disolvente y tiempo de extracción. A pesar de que los rendimientos de TPC y TFC por MUAE no fueron más altos (Tuckey, $p < 0.05$) que los obtenidos por RE, es notable que la temperatura usada en MUAE fue la mitad de lo requerido en RE. Este hecho provee una ventaja a la tecnica MUAE sobre la extracción de compuestos bioactivos en plantas. Las mejores obtenciones de TPC y TFC fueron encontradas con E75–30 min > E100–120 min > E100–60 min. Los extractos E100 no presentaron diferencia significativa con respecto al tiempo. En casi todos los disolventes usados con largo tiempo de extracción mostraron los TPC más altos y TFC más bajos. Solo E75 mostró un comportamiento opuesto para el

rendimiento de TPC y E100 para el rendimiento de TFC a lo largo del tiempo, donde no se observaron diferencias significativas.

Estos resultados obtenidos son debido a los efectos del ultrasonido y microondas en las muestras. La fase líquida y las células absorben la irradiación, incrementando la energía cinética de las moléculas y consecuentemente ocasionando una mas rápida transferencia de masa y una mayor extracción de sustancias activas (Alupului *et al.*, 2012). Rashed *et al.* (2016) reportaron resultados similares cuando se usan técnicas cooperativas de microondas y ultrasonidos para compuestos antioxidantes, donde la técnica asistida por microondas puede reducir las restricciones internas de transferencia de masa mientras que la técnica asistida por ultrasonido básicamente reduce las limitaciones de transporte externas y puede romper las membranas celulares reduciendo el control de transporte de masa interna, además del efecto de refuerzo mutuo de la temperatura y la polaridad de la mezcla de disolventes. Mientras tanto, el desempeño de técnica convencional (RE) depende solo de la temperatura de ebullición del disolvente y de la polaridad del disolvente, que al pasar dentro de la célula de la planta disuelve sus componentes. Además de usar temperaturas por debajo del punto de ebullición del disolvente de extracción, hace la extracción de compuestos bioactivos mucho mejor ó alto al ser comparado con métodos de extracción convencional que usan condiciones de ebullición de los disolventes (Mandal *et al.*, 2007). Por otra parte, a mayores tiempos de exposición a microondas y/ó ultrasonido de algún material biológico, puede mostrar efectos negativos como oxidación, degradación y/ó polimerización de compuestos fenólicos ó flavonoides (Novak *et al.*, 2008; Garofulić *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2016).

1.3.3 Actividad antioxidante

Con la finalidad de evaluar la actividad antioxidante (AA) de los extractos de SM, se realizaron los ensayos DPPH y ABTS y se determinó el IC₅₀ de los extractos por RE y MUAE como se muestra en la Figura 1.5. Para los extractos de RE (figuras superiores), la mayor actividad antioxidante significativa (Tukey, p<0.05) fue observada por el extracto E50-120min tanto por DPPH como por ABTS. El disolvente de extracción usado no solo influyó en el contenido de TPC y TFC, sino también en la actividad antioxidante de los extractos. Por ejemplo, la actividad antioxidante de los extractos RE se mostraron como E50> E75>

E100> E0 para ABTS y E50> E75> E0> E100 para DPPH. El tiempo de extracción mostró un efecto significativo principalmente en el extracto E50, donde el tiempo de extracción más prolongado tuvo mejor actividad antioxidante, con valores más bajos de IC_{50} ($12.31 \pm 0.02 \mu\text{g}_{\text{SST}}/\text{mL}$ para ABTS y $17.02 \pm 0.26 \mu\text{g}_{\text{SST}}/\text{mL}$ para DPPH). Hubo varias diferencias en el comportamiento de la actividad antioxidante entre los ensayos usados, principalmente sobre los extractos E0, E75 y E100. Estas diferencias pueden estar relacionadas a la naturaleza química de los compuestos bioactivos presentes en cada extracto, y a la naturaleza del radical usado para la medición de esta propiedad, el cual se discutirá más adelante.

Para los extractos MUAE (figuras inferiores), las actividades antioxidantes fueron más altas dependiendo del ensayo empleado. Por ejemplo, el ensayo ABTS mostró que E100-30min, E100-120min y E75-120min tuvieron mejor actividad al obtenerse valores más bajos de IC_{50} ($11.56 \pm 0.59 \mu\text{g}_{\text{SST}}/\text{mL}$ en promedio), mientras que el tratamiento E50-120 min por DPPH fue el valor más bajo ($14.40 \pm 0.69 \mu\text{g}_{\text{SST}}/\text{mL}$).

Estas diferencias en los resultados de los extractos sobre ABTS y DPPH pueden ser atribuidos a diferencias en la polaridad de los disolventes que afectan el mecanismo principal de la transferencia de electrones que involucran ambas técnicas. El radical catión ABTS ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) es reactivo hacia más antioxidantes, es soluble tanto en disolventes acuosos como orgánicos, y puede ser aplicado sobre un amplio rango de pH y/o fuerza iónica. Mientras que el DPPH es basado principalmente sobre la reacción de transferencia de electrones y las interacciones entre antioxidantes-radicales DPPH (DPPH^{\bullet}) son también determinadas por la conformación estructural de los antioxidantes. Por lo que algunos compuestos reaccionan rápidamente con DPPH^{\bullet} , reduciendo el número de DPPH^{\bullet} en correspondencia a el número de grupos hidroxilo disponibles en los compuestos antioxidantes (Martysiak-Żurowska & Wenta, 2012). Sin embargo, las reacciones parecen ser más lentas en la mayoría de los antioxidantes, causando disparidad entre ambas técnicas (Brand-Williams *et al.*, 1995).

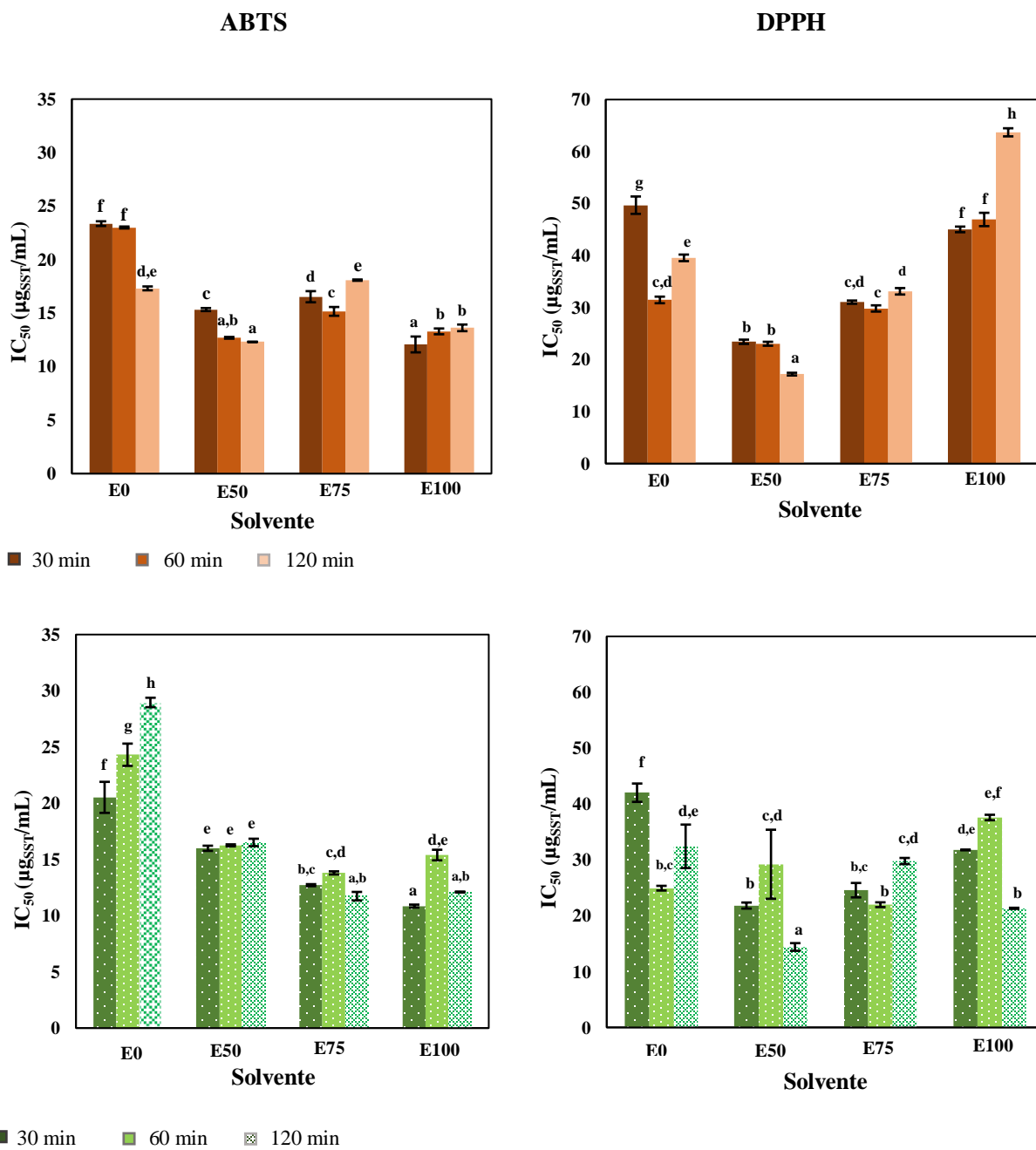


Figura 1.5. Actividad antioxidante de extractos RE (figuras superiores) y MUAE (figuras inferiores) de SM.

Por lo tanto, el método DPPH dio valores de IC₅₀ más altos que los encontrados en el ensayo de ABTS y consecuentemente menor actividad antioxidante, probablemente porque tiene

más limitaciones y en algunas matrices menor sensibilidad y más baja velocidad de reacción antioxidante-radicales que en el ensayo ABTS.

Los extractos de SM contienen diversos tipos de compuestos fenólicos, cuya extracción está directamente relacionada con la compatibilidad de los compuestos con el sistema disolvente, y la actividad antioxidante es un resultado de la reacción de la suma de los componentes individuales del sustrato con el radical libre usado en cada ensayo (Molyneux, 2004; García-Márquez *et al.*, 2012).

1.3.4 Análisis de correlación de Pearson

Con el objeto de apreciar mejor las relaciones entre las actividades antioxidante, contenido de fenoles y flavonoides, una correlación de Pearson de ensayos bajo condiciones de extracción RE y MUAE fue realizada (Tabla 2). Bajo la variable disolvente (Tabla 2) para extractos RE, las correlaciones con rendimiento y ABTS fueron negativas y altamente significativas ($p < 0.01$). Este resultado sugiere que el incremento de la polaridad del disolvente en la extracción provoca que los compuestos con actividad antioxidante no tengan alta afinidad o fueran menos polares que los disolventes. Por otro lado, correlaciones entre disolvente, TPC y TFC fueron positivas y altamente significativas ($p < 0.01$). Este resultado conduce a que a mayor contenido de etanol promueve la mejor solubilidad y obtención de compuestos fenólicos y flavonoides. La correlación disolvente con DPPH no fue significativa. Este comportamiento también fue observado en extractos MUAE. Así que para ambos sistemas de extracción, las diferencias en la polaridad del disolvente fueron apropiados para el rendimiento de fenólicos y flavonoides.

En el caso de tiempo de extracción (Tabla 1.2), este parámetro solo fue correlacionado negativamente con TPC ($p < 0.01$) para extractos RE. Esto puede sugerir que debido a altas temperaturas usadas en esta técnica, largos tiempos causan la degradación de fenólicos y flavonoides contenidos en estos extractos. En los extractos MUAE, el tiempo de extracción no tuvo alguna correlación significativa con alguna de las variables.

Bajo el parámetro de rendimiento (SST) (Tabla 1.2), una correlación positiva con ABTS fue encontrada para extractos RE y MUAE. Esto sugiere que la mayoría de los compuestos extraídos, contribuyeron a la actividad antioxidante de los extractos de SM. Por otro lado una correlación negativa fue observada entre SST, TFC ($p < 0.01$) y TFC ($p < 0.05$) para RE, y solo entre SST y TPC para MUAE. Esto sugiere que no todos los compuestos extraídos corresponden a fenólicos y/o flavonoides. Probablemente algunos de los compuestos fueron polimerizados o degradados debido a las condiciones de temperatura y tiempo de extracción. Con respecto a TPC fue positivamente correlacionado con ABTS para extractos RE y MUAE, mientras que el parámetro TFC fue negativamente correlacionado con ABTS en ambos extractos. Así que se podría concluir que existen otros compuestos fenólicos diferentes de los flavonoides que contribuyen a la actividad antioxidante por ABTS de los extractos de SM. Adicionalmente, un sinergismo de compuestos fenólicos entre sí y otros compuestos con actividad antioxidante presentes en el extracto pueden contribuir a la capacidad antioxidante globalmente observada (Mokrani & Madani, 2016).

Finalmente, para DPPH no observó una clara tendencia y solo tuvo una correlación significativa con TPC en extractos RE. Esto puede ser atribuido a los inconvenientes del ensayo y la naturaleza química de las sustancias activas contenidas en SM. Por lo tanto, esta información es útil para aclarar las relaciones entre la composición de disolvente y la técnica de extracción sobre el rendimiento de compuestos fenólicos, flavonoides y su actividad antioxidante. La correlación de Pearson mostró que ABTS fue la única técnica que tuvo una correlación significativamente alta con TPC. Por esta razón, la identificación de los compuestos principales de SM y su actividad citotóxica se realizó sólo para aquellos extractos que dieron valores de TPC significativamente más altos y un IC_{50} más bajos para ABTS.

Tabla 1.2 Coeficientes de correlación de Pearson entre diferentes ensayos,^a bajo la influencia de las condiciones de extracción (n=3)^b.

	Extracto RE					Extracto MUAE				
	SST	TPC	TFC	DPPH	ABTS	SST	TPC	TFC	DPPH	ABTS
Disolvente	-0.669**	0.648**	0.639**	0.245 ^{ns}	-0.727**	-0.729**	0.845**	0.929**	-0.178 ^{ns}	-0.883**
Tiempo	0.097 ^{ns}	-0.386**	0.034 ^{ns}	0.070 ^{ns}	-0.161 ^{ns}	0.056 ^{ns}	0.123 ^{ns}	-0.185 ^{ns}	-0.308 ^{ns}	0.154 ^{ns}
SST		-0.339*	-0.889**	-0.681**	0.472**		-0.465**	-0.729**	-0.192 ^{ns}	0.481**
TPC			0.259 ^{ns}	-0.142 ^{ns}	0.577**			0.795**	-0.341**	0.753**
TFC				0.471**	-0.510**				-0.088 ^{ns}	-0.877**
DPPH					0.108 ^{ns}					0.235 ^{ns}

^a Rendimiento de extracción en sólidos solubles totales (SST), (TPC) contenido de fenoles totales, (TFC) contenido de flavonoides totales, actividad de inhibición de radical DPPH, actividad de inhibición de radical ABTS, extractos obtenidos por reflujo (RE), extractos obtenidos por asistencia de microondas-ultrasonido (MUAE).

^b Numero de réplicas.

^{ns} No significativo.

* Significativo con $p < 0.05$.

** Significativo con $p < 0.01$

1.3.5 Perfil cromatográfico e identificación de compuestos

Los extractos E50–120 min de RE y E100–30 min de MUAE fueron los elegidos para la identificación de compuestos. De acuerdo con reportes de Askun *et al.* (2012) y Chkhikvishvili *et al.* (2013), varios compuestos como el ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido gálico, ácido rosmarínico, naringenina, catequina, carvacrol, y quercetina fueron identificados en algunas especies de *Satureja*. Por lo cual, estos compuestos fueron utilizados para la identificación de los compuestos mayoritarios de los extractos de SM en este estudio. El extracto RE se encontró constituido principalmente por nueve diferentes compuestos (Figura 1.6a) con tiempos de retención de 3.052, 4.708, 6.472, 13.805, 15.497, 20.966, 29.228, 30.553 y 31.879 min. Para el caso de MUAE, mostró ocho diferentes compuestos principales (Figura 1.6b) con tiempos de retención de 2.988, 3.076, 4.726, 6.555, 13.855, 15.563, 20.736 y 20.146 min. De acuerdo a los valores de tiempo de retención (t_r), solo ácido rosmarínico se presentó en ambos extractos a 15.553 ± 0.128 min (pico 5 para RE y pico 6 para MUAE), así mismo correspondió al compuesto mayoritario en los extractos.

La concentración de ácido rosmarínico fue estimado en 605.67 ± 5.43 $\mu\text{g/g}_{\text{TSS}}$ para RE y 1330.32 ± 6.29 $\mu\text{g/g}_{\text{TSS}}$ para extractos MUAE. Otro compuesto identificado en ambos extractos fue el ácido cafeico (pico 1). Pero debido al bajo rendimiento y menor área de pico el ácido rosmarínico fue usado como compuesto representativo para establecer una cuantificación. A partir de estos resultados, se puede observar que la concentración de ácido rosmarínico fue significativamente mayor para la técnica de extracción de MUAE, lo que sugiere que los mecanismos y variables de extracción de los procesos son mejores que el uso extensivo de altas temperaturas involucrados en RE, lo cual puede promover la degradación de los compuestos fenólicos de SM.

Los extractos fueron sometidos a cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas (LC-MS) para identificar otros compuestos presentes en RE y MUAE que no fueron identificados por LC-DAD. En la Tabla 1.3 se muestran los compuestos tentativamente identificados en los extractos RE y MUAE.

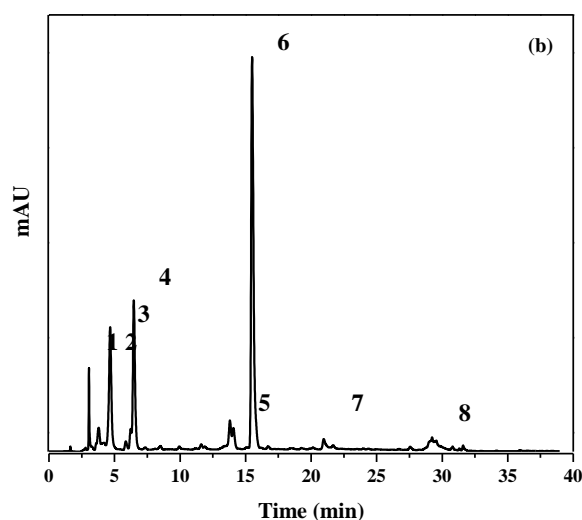
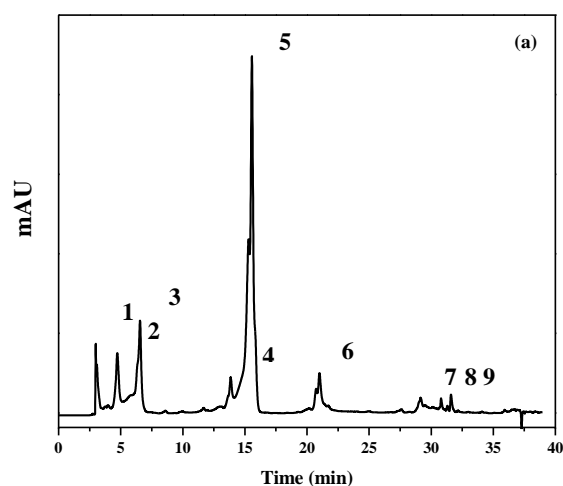


Figura 1.6. Perfil cromatográfico (LC-DAD) de extracto: a) RE E50-120min y b) MUAE E100-30min.

Para la caracterización de los compuestos, los datos se procesaron con el software Data Analysis 4.1 (Bruker compass), el cual es capaz de ofrecer una lista de posibles fórmulas moleculares empleando el editor SmartFormula. Este editor utiliza un algoritmo CHNO, que posee una serie de funcionalidades como el rango elemental mínimo/máximo, la configuración electrónica, equivalentes de dobles enlaces y anillos, así como una comparación del patrón isotópico teórico y experimental (*mSigma*) para conseguir una mayor seguridad en la fórmula molecular propuesta. El umbral de exactitud más ampliamente usado por la comunidad científica para la confirmación de la composición

elemental se establece en 5 ppm. La identificación de los compuestos se llevó a cabo mediante la utilización de estándares. Para aquellos compuestos que no se utilizaron estándares fueron identificados mediante información disponible en bibliografía (comparación de masa, fórmula iónica y error de los compuestos detectados) y base de datos como ChEBI (<https://www.ebi.ac.uk/chebi/>). La Tabla 1.3 muestra los datos de MS de los compuestos tentativamente identificados.

Tabla 1.3. Compuestos identificados por LC–MS en modo ión negativo [M-H]⁻ de extractos de *Satureja macrostema*.

Ión molecular (m/z)	Formula iónica	Compuestos tentativos	Detectado en
191.0560	C ₇ H ₁₁ O ₆	Ácido quinico ^c	RE, MUAE
179.0344	C ₉ H ₇ O ₄	Ácido cafeico ^{a,b}	RE, MUAE
353.0866	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	Ácido clorogénico ^{a,b}	RE, MUAE
579.1732	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₄	Naringina ^a ,	RE, MUAE
595.1663	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅	Eriodictiol rutinosido ^d	RE, MUAE
337.0923	C ₁₆ H ₁₇ O ₈	Ácido coumaroilquínico ^c	RE, MUAE
609.1829	C ₂₈ H ₃₃ O ₁₅	Hesperidina ^{a,c}	RE, MUAE
359.0774	C ₁₈ H ₁₅ O ₈	Ácido rosmarínico ^{a,b}	RE, MUAE
283.0623	C ₁₆ H ₁₁ O ₅	Acacetina ^b	RE, MUAE
269.0451	C ₁₅ H ₉ O ₅	Apigenina ^{b,c}	RE, MUAE
577.1535	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₄	Apigenina-7-O-rutinoside ^b	RE, MUAE
163.0391	C ₉ H ₇ O ₃	Ácido coumárico ^{a,b}	RE, MUAE
329.0647	C ₁₇ H ₁₃ O ₇	Quercetin dimethyl miricetin	RE, MUAE
197.0445	C ₉ H ₉ O ₅	Ácido siríngico ^{b,c}	RE, MUAE
435.1284	C ₂₁ H ₂₃ O ₁₀	Floridzina ^b	MUAE
447.101	C ₂₁ H ₂₃ O	Luteolina-7-O-glucósido ^b	RE

^a Identificación confirmado usando estándar comercial

^b Compuestos identificados por comparación de literatura (Hossain *et al.*, 2010)

° Compuestos identificados por comparación de literatura (Vallverdú-Queralt *et al.*, 2015)

1.3.6 Citotoxicidad

Satureja macrostema ha sido usado en la medicina tradicional desde tiempos ancestrales; previos resultados, mostraron que las técnicas de extracción por RE y MUAE proporcionan extractos funcionales con alta actividad antioxidante principalmente debido a los compuestos fenólicos que contienen los extractos. A pesar de esta información conveniente, y debido a la falta de información acerca la seguridad del consumo humano, la actividad citotóxica de extractos de SM por medio de la determinación de la viabilidad celular llega a ser una prioridad para garantizar su seguridad al consumirla.

Ensayos más comunes para medir la citotoxicidad son basados en la viabilidad celular mediante ensayos colorimétricos como RN y/ó MTT (Chiba *et al.*, 1998). Para excluir el posible efecto citotóxico del extracto E50-120min obtenido por RE y E100-30min por MUAE, dos concentraciones de polvos liofilizados de los extractos (0.1 y 1.0 mg/mL disueltos en DMSO a una concentración final de 0.5) fueron probados evaluando la actividad metabólica celular sobre cultivos de linfocitos de sangre periférica humana.

El ensayo RN es basado en la incorporación de el colorante supravital dentro de los lisosomas de células viables, donde sólo las células vivas y no lesionadas son capaces de acumular y administrar la absorción activa de colorante rojo neutro (Chan *et al.*, 2015). Este ensayo demostró que ninguno de los extractos fue significativamente diferente con respecto al grupo control (I) (Tuckey, $p < 0.05$) (Figure 1.7a), con una viabilidad celular alrededor de $124.23 \pm 26.93\%$. Entonces, viabilidades celulares superiores al 100% sugieren que los extractos SM pueden permitir la supervivencia celular y no alteran la actividad lisosomal.

El ensayo MTT es basado en la reducción de MTT en cristales de formazán por células vivas. El poder de reducción intracelular es principalmente proveído por NAD(P)H, el cual es derivado de la deshidrogenasa (Chan *et al.*, 2015). La viabilidad celular promedio medido a través del ensayo MTT fue de $104.29 \pm 21.41\%$ sin diferencia significativa (Tuckey $p < 0.05$) comparado con el grupo control de células no tratadas (Figura 1.7b). Sin embargo, el porcentaje de viabilidad celular del control vehículo (grupo II) fue

cuadruplicado. Este comportamiento puede ser debido a la toxicidad del DMSO induciendo la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). A pesar de que el DMSO ha sido ampliamente usado a diferentes concentraciones (0.5-1.5%), como disolvente para varios agentes farmacológicos tanto en cultivo de células como estudios in vivo (Yuan *et al.*, 2014), también se ha reportado que diferentes tipos de células muestran diferente sensibilidad al DMSO. Por otra parte el tiempo de exposición incrementa la toxicidad, este fue corroborado para el caso específico de cultivo de linfocitos de sangre periférica humana (dato no mostrado). No es posible pensar en una proliferación celular con estos datos, debido a que este efecto no fue observado en el ensayo RN.

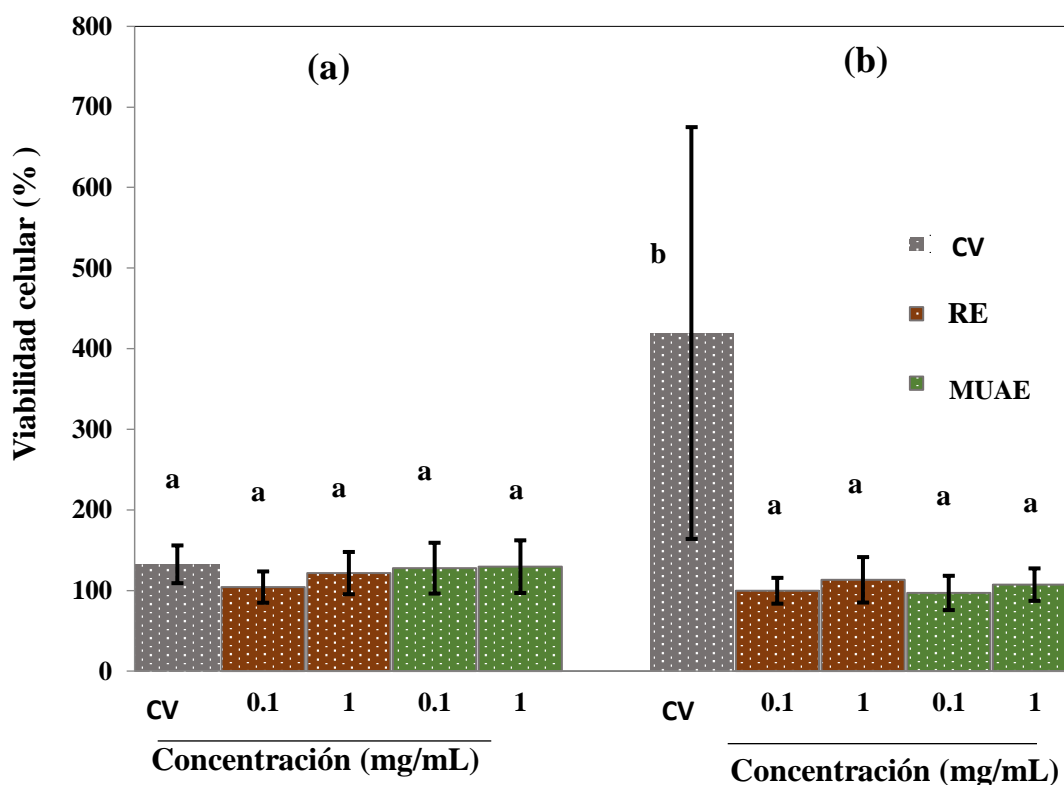


Figura 1.7. Viabilidad celular (%) de diferentes concentraciones de extractos E50-120min (RE), E100-30min (MUAE) y control vehículo (CV), obtenidos por RN (a) y MTT (b) comparados con un control negativo (linfocitos no tratados). Misma letra indica que no hay diferencia significativa entre los tratamientos (Tuckey, $p < 0.05$).

A pesar del uso de DMSO a la misma concentración que el control en los grupos III-VI, no fue mostrado este efecto, lo cual demuestra evidencia de que los extractos permiten la

supervivencia celular así como contribuir a reducir el nivel basal de ROS. La adición de extractos de SM a concentraciones de 0.1 y 1.0 mg/mL en cultivos de linfocitos mostraron un comportamiento similar a las células no tratadas (grupo D), y este comportamiento puede ser atribuido a su contenido de fenólicos y/o propiedades antioxidantes, ya que éste tipo de compuestos atrapan a las ROS derivadas del metabolismo celular.

1.4 Conclusiones del capítulo I

- Extractos etanólicos de SM demostraron tener alto rendimiento de fenoles y buena actividad antioxidante, con alta dependencia por la composición del disolvente y técnica de extracción.
- Las diferencias en rendimiento y actividad antioxidante son principalmente relacionadas a las diferencias de temperatura, tiempo de extracción, método de extracción, afinidad y polaridad de los disolventes, compuestos fenólicos y la termoestabilidad de los compuestos extraídos.
- La aplicación de MUAE para la extracción de compuestos fenólicos mostraron tener ventajas sobre la extracción por RE.
- La correlación de Pearson mostró que ABTS es el mejor ensayo para la estimación de la actividad de atrapamiento de radicales de extractos de SM, presentando alta correlación con TPC ($p < 0.01$ y 0.05).
- Las mejores condiciones elegidas para la identificación de compuestos y evaluación de citotoxicidad fueron E50-120 min para RE y E100-30 min para MUAE, esto debido al mayor valor significativo de TPC y más bajos valores de IC_{50} .
- El ácido rosmarínico fue el compuesto mayoritario de los extractos de SM. Su obtención fue altamente influenciado por la técnica de extracción, ya que por MUAE ($1330.32 \pm 6.29 \mu\text{g/g}_{\text{TSS}}$) se obtuvo mayor concentración que el obtenido por RE ($605.67 \pm 5.43 \mu\text{g/g}_{\text{TSS}}$).
- El análisis de LC-MS permitió la identificación tentativa de 14 compuestos presentes en ambos extractos.
- Los extractos liofilizados de $RE_{E50-120 \text{ min}}$ y $MUAE_{E100-30 \text{ min}}$ no demostraron efecto citotóxico sobre la actividad mitocondrial y lisosomal, mostrando una viabilidad celular comparable a la exhibida el control negativo (linfocitos no tratados).

CAPÍTULO II

EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE *Satureja macrostema* Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD FUNCIONAL

2.1 Marco teórico

Los aceites esenciales (AE) son compuestos volátiles, naturales y complejos caracterizados por un fuerte olor, raramente coloreados, solubles en lípidos y disolventes orgánico, y son formados por plantas aromáticas como metabolitos secundarios (Bakkali *et al.*, 2008). Se pueden extraer de las semillas, flores, hojas, corteza de madera, tallos, frutas, rizomas y raíces de una amplia variedad de arbustos vegetales y especies arbóreas (Nasshorudín *et al.*, 2016).

Los AE generalmente tienen entre 2 y 3 compuestos principales a concentraciones bastante altas (20-70%) comparado a otros componentes presentes en cantidades de trazas. La mayoría de los AE son compuestos de terpenoides y terpenos y otros constituyentes aromáticos y alifáticos, todos caracterizados por su bajo peso molecular. Los terpenos son el principal grupo de productos naturales caracterizados por una gran variedad de tipos estructurales y los compuestos más valiosos. Los compuestos terpénicos son hidrocarburos de fórmula general $(C_5H_8)_n$ formados a partir de unidades de isopreno (figura 2.1). Estos compuestos pueden ser acíclicos, monocíclicos, bicíclicos o tricíclicos. En base a la diversidad en su estructura química son clasificados en varios grupos como monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15) y diterpenos (C20). La mayoría de los componentes de los aceites esenciales son monoterpenos y representan aproximadamente el 90% de los aceites esenciales. El perfil químico de AE varía en el número moléculas, propiedades estereoquímicas de las moléculas, y del tipo de extracción. Los productos de extracción pueden variar en cantidad, calidad y en la composición de acuerdo al clima, composición del suelo, órgano de la planta, edad y etapa del ciclo vegetativo (Akthar *et al.*, 2014).

Los métodos de producción convencionales de aceites tales como la destilación con vapor o la extracción con disolvente pueden conducir a la degradación de compuestos sensibles al calor y a la hidrólisis parcial de compuestos sensibles al agua. En el proceso de extracción con disolvente, se requiere otro proceso de separación para separar el soluto del disolvente, que es usualmente costoso y algunas veces se observa el problema residual del disolvente. La extracción por fluidos supercríticos es un proceso alternativo eficaz a los métodos convencionales que han recibido creciente atención en una variedad de campos debido a los siguientes factores:

- (i) Los fluidos supercríticos proporcionan solubilidad y velocidades de transferencia de masa;
- (ii) La operación puede manipularse cambiando la presión o temperatura y
- (iii) La facilidad de separación del soluto extraído del disolvente supercrítico por simple expansión. El fluido supercrítico tiene densidad líquida, baja tensión superficial y viscosidad y alta difusividad. La difusividad del fluido supercrítico es de uno a dos órdenes de magnitud que las de otros líquidos, lo que permite una rápida transferencia de masa, lo que resulta en una tasa de extracción mayor que la obtenida por métodos convencionales (Roy *et al.*, 2006).

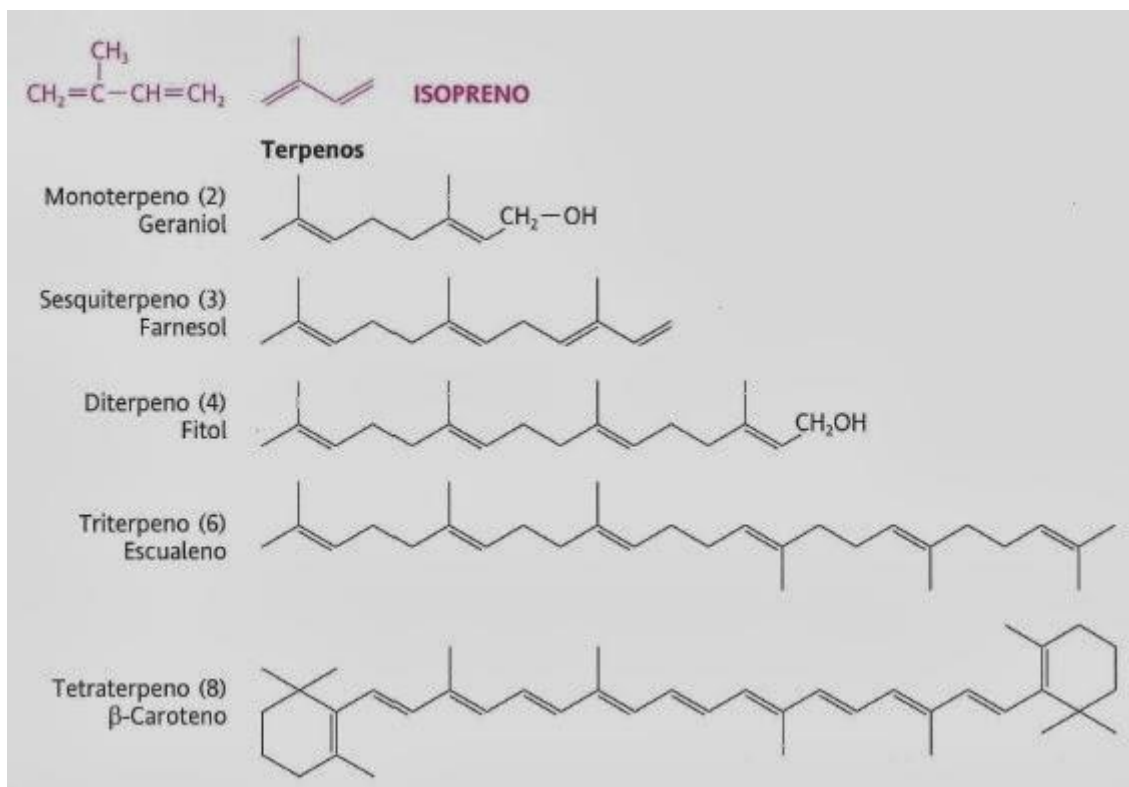


Figura 2.1. Estructura del isopreno y ejemplos de terpenos.

Los aceites esenciales de diferentes especies de *Satureja* han sido ampliamente estudiados por sus actividades analgésicas (Hajhashemi *et al.*, 2012), antioxidantes (Cávar *et al.*, 2008), antiviral, antiespasmódico (Hajhashemi *et al.*, 2000), antiinflamatorias (Hajhashemi *et al.*, 2012), antidiarreica y antimicrobianas (Bezić *et al.*, 2005). La presencia de componentes tales como carvacrol, timol, ρ -cimeno, camfor, y espatulenol que son conocidos por su actividad antibacterial, especies de *Satureja* previamente

estudiados exhibieron alta actividad antibacterial. Sin embargo, es difícil atribuir la actividad antibacterial de AE por sus componentes mayoritarios debido a que los AE son una mezcla compleja de diferentes componentes. La interacción entre los componentes minoritarios o mayoritarios, puede producir los siguientes efectos sobre las actividades biológicas: indiferente, aditiva, antagonista o sinérgica (Seidi *et al.*, 2016). Además, la actividad antimicrobiana y antioxidante y otras actividades biológicas pueden variar, debido a las variaciones en composiciones químicas de los aceites esenciales y a la especie de la planta (Alizadeh, 2005).

Por lo que en este capítulo se determinará la actividad antioxidante y antimicrobiana, así como la caracterización química del aceite esencial de *Satureja macrostema*. El aceite se obtendrá mediante un método convencional (HD) y uno de actualidad como es la extracción por fluidos supercríticos (SFE). Este capítulo corresponde al objetivo 2.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Material vegetal

La planta fue colectada durante el mes de Diciembre del 2015 Santa María Lachixío, Zimatlán Oaxaca (16° 47' 51,71" N; 97° 2' 24,8" W). Las hojas fueron desprendidas y secadas bajo sombra durante 1 semana. Posteriormente fueron molidas y tamizadas usando una malla 16 (1.19mm), luego fueron almacenadas a temperatura ambiente en bolsas de plástico negro hasta su uso.

2.2.2 Reactivos

Sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4), β -caroteno, ácido linoleico, tween 20, cloroformo (CH_3Cl), agar Mueller-Hilton, caldo nutritivo (CN), agar de soya trpticaseina (TSA), agua destilada.

2.2.3 Extracción de aceite esencial de *S. macrostema*

2.2.3.1 Extracción por hidrodestilación (HD)

Las hojas secas fueron sometidas a una hidrodestilación, durante 4 h usando una trampa tipo Clevenger (Figura 2.2). Se utilizó 100 g de hojas secas y 1 L de agua destilada. El

aceite extraído fue secado con sulfato de sodio anhidro, filtrado y almacenado en un vial ámbar a 4°C hasta su análisis.



Figura 2.2. Esquematización del sistema de hidrodestilación para extracción de aceites esenciales de SM (trampa tipo Clevenger).

2.2.3.2 Extracción con fluido supercrítico (SFE)

8 g de hojas tamizadas con tamaño promedio de 1.19 mm, fueron colocadas en un costal de tela para un mejor manejo de muestra e introducido en el vial de un extractor supercrítico modelo SFT-100 Scientific System., Inc., State College, PA, USA (Figura 2.3). Las condiciones investigadas para la extracción de aceite esencial fueron presión (1,450, 2,180, 2,900 y 3,630 psi), temperatura (40°, 60° y 80°C), flujo de CO₂ (20 mL/min) y tiempo de extracción (60 min) constantes.



Figura 2.3. Esquematización del sistema de extracción por SFE.

2.2.4 Caracterización del aceite esencial

2.4.1 Rendimiento de extracción

El rendimiento de extracción de aceite esencial fue calculado mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento de extracción (\%)} = \frac{A}{B} \times 100$$

Donde A es el peso en gramos de aceite esencial obtenido, y B es el peso expresado en gramos de hojas secas tamizadas tomados antes del proceso de extracción.

2.2.4.2 Actividad antioxidante mediante DPPH

Se determinó la actividad antioxidante mediante la técnica DPPH mencionado en la sección 3.4.4.

2.2.4.3 Evaluación de la actividad antioxidante por decoloración de β -caroteno/ácido linoléico

La actividad antioxidante de AE fue evaluado por el ensayo de blanqueamiento β -caroteno/ácido linoléico, según Miller (1971) con ligeras modificaciones. Una solución stock de β -caroteno-ácido linoleico fue preparado de la siguiente forma: 0.5 mg de β -caroteno disuelto en 1 mL de cloroformo (grado HPLC); 25 μ L de ácido linoleico y 200 mg de tween 20 fueron adicionados. El cloroformo fue removido mediante un evaporador al vacío. Después, 100 mL de agua adicionada con oxígeno (30 min a un flujo de 100 mL/min) fue agregado. Alícuotas de 2.5 mL de esta mezcla fueron colocadas en tubos y 350 μ L (2 mg/mL) de AE fueron adicionados. La emulsión fue incubada por 48 h a temperatura ambiente. El mismo procedimiento fue realizado con BHT como control positivo y un blanco conteniendo únicamente etanol. Después del periodo de incubación, absorbancias de las muestras fueron medidas a 490 nm. La actividad antioxidante relativa (AAR) del AE fue calculada de la siguiente forma:

$$\% AAR = \left[\frac{\text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia BHT}} \right] * 100$$

2.2.5 Identificación de compuestos mediante GC/MS

Se utilizó un cromatógrafo de gases acoplado a espectroscopía de masas (GC-MS) modelo 6850 (Agilent Technologies, USA) equipado con una columna HP-5ms (Agilent Technologies, 30 m x 0.25 mm i.d., y 0.25 μ m espesor de película, USA). La columna fue programada de la siguiente manera: 20°C durante 3 min, incrementando a 300°C (20°C/min). La temperatura del inyector fue 280°C. Los porcentajes de las áreas de pico fueron determinados usando el software integrador RTE (Agilent Technologies, USA) la identificación de los compuestos fue llevada a cabo mediante el espectrómetro de masas

(SM) que está acoplado al cromatógrafo de gases (CG-SM) modelo 5975C (Agilent Technologies, USA). Las muestras fueron ionizadas por impacto electrónico de 70 eV y la temperatura alcanzada por la fuente de ionización fue 230°C. La columna usada fue una HP-5ms (Agilent Technologies, 30 m x 0.25 mm i.d., and 0.25 µL film thickness, USA). Las condiciones de separación fueron: temperatura inicial de 300°C por dos minutos, ascendiendo con dos rampas de 20°C/min hasta alcanzar 230°C, y la segunda, incrementando de 8° C/min hasta alcanzar 280°C, esta temperatura fue mantenida por cinco minutos. Helio fue usado como fase móvil con un flujo de 1 mL/min con un volumen de inyector de 1 µL usando un inyector tipo Split. La identificación de los componentes químicos se realizó mediante la base de datos NIST Library versión 8.0 (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología, Gaithersburg, MD, EE.UU.) y por las comparaciones con los índices de retención basado en el HP-5ms.

2.6 Evaluación de la actividad antibacterial del aceite esencial de *S. macrostema*

Tres cepas de bacterias fueron utilizados, dos gram negativas: *Salmonella entérica* (ATCC 43971) y *Escherichia coli* sp., y una gram positiva: *Staphylococcus aureus* (ATCC 13709). Los inóculos utilizados se obtuvieron a partir de cultivos en agar nutritivo (CN) a 37°C. Se realizó una suspensión celular en diluidas en solución salina estéril (8.5 g/L) hasta obtener una concentración final de aproximadamente 10⁸ unidades formadoras de colonias por mL (UFC / mL), ajustada de acuerdo con la turbidez del tubo estándar de 0.5 McFarland.

2.2.6.1 Efecto inhibitorio mediante el método de difusión en disco

El método de difusión en disco para determinación de la actividad antioxidante del aceite esencial fue realizado mediante la técnica descrita por Oke *et al.* (2009). 100 µL de suspensión del microorganismo a probar, fue esparcido en agar Muller-Hilton. Discos de papel filtro (6 mm de diámetro) fueron impregnados con 10 µL de aceite esencial diluido y colocados sobre cajas inoculadas, las cuales fueron almacenadas a 4°C durante 2 horas y después incubadas por 24 h a 37°C. Los diámetros (mm) de las zonas de inhibición fueron medidos. Discos de antibióticos de eritromicina (15µg/disco) fue usado como control positivo.

2.2.6.2 Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) mediante el método de macrodilución

Los valores de CMI de AE de SM fue determinado de acuerdo al procedimiento macrodilución en caldo de acuerdo a De Azeredo et al. (2011) con ligeras modificaciones. Cuatro mililitros de CN fue inoculado con 1 mL de suspensión bacteriana, mezclado con 5 mL de diluciones dobles de AE en un rango de concentraciones de 10-0.15 mg/mL, y seguido de una agitación en el vortex. Se preparó una solución stock de AE en DMSO y diluido en CN. El sistema fue estáticamente incubado por 24 h a 37°C. La determinación de CMI se llevó a cabo mediante recuento bacteriano en agar de soya trpticaseina (TSA), en lugar de turbidimetría para evitar la falsa turbidez causada por la interferencia del aceite. La CMI se definió como la concentración más baja a la que se redujo la viabilidad del inóculo hasta el 90% y se definió CMB como la concentración más baja a la que se redujo la viabilidad del inóculo al 99,9% o al crecimiento aparente.

2.3 Resultados y discusiones

2.3.1 Rendimiento

Dos métodos de extracción fueron llevados a cabo para la obtención de aceite esencial y las comparaciones se presentan en la Tabla 2.1. Se obtuvo un aceite amarillento (Figura 2.4) con una densidad de 0.9592 g/mL y un rendimiento de 107.8 mg por cada 100 g de hojas secas. Este bajo rendimiento puede ser debido a la afinidad entre el disolvente y el soluto, además, a altas temperaturas, algunos compuestos volátiles pueden perderse (Azmir & col, 2013). De acuerdo con Niemeyer (2010), el rendimiento de aceite está correlacionado con la naturaleza del quimiotipo.



Figura 2.4. Aceite esencial de *S. macrostema* obtenido por hidrodestilación.

Por otra parte, como se puede apreciar en la Tabla 2.1, el rendimiento de aceite con SFE fue mayor (>0.1162 % p/p) al obtenido por HD. La extracción por HD fue operada por 4 h y la extracción por SFE usando CO₂ únicamente 1 h. Cabe mencionar que debido a

problemas con el gas (costo y suministro), no se realizaron los experimentos por triplicado, únicamente para el caso de 1450 y 2900 psi a 40°C se realizó una segunda extracción, para todos los demás solo se efectuó una extracción. Aun así se puede observar el al efecto de la temperatura sobre el rendimiento del aceite esencial de SM obtenido por SFE (Tabla 2.1). Hay un incremento en el rendimiento de AE cuando la temperatura es elevada, este comportamiento también fue reportado por Genena *et al.* (2008). Esto puede ser debido a que al aumentar la temperatura, también se acelera la transferencia de masa y mejora el rendimiento de extracción. El aumento de la temperatura puede aumentar la presión de vapor de los compuestos extraíbles. De este modo, la tendencia de los compuestos a extraerse es incrementado al pasar por la fase fluida supercrítica (Bimakr *et al.*, 2011). Los mejores resultados fueron obtenidos a 80°C.

Tabla 2.1 Comparación de rendimiento de extracción de aceite esencial de *S. macrostema* obtenido mediante HD y SFE.

Presión (psi)	Rendimiento gAE/100 g hoja seca			HD
	40°C	60°C	80°C	
1450	0.14625/0.14875	0.2275	0.4825	0.1078±0.014
2180	0.17	0.3975	0.5825	
2900	0.3525/0.175	0.1162	0.81	
3630	0.1325	0.8287	1.0625	

Con respecto al efecto de la presión sobre el rendimiento de AE, la cantidad de aceite extraído aumenta conforme aumenta la presión, a una temperatura constante. Esto es debido al incremento de la presión de extracción a temperatura constante, el cual incrementará la solubilidad de los analitos debido al aumento de la densidad de CO₂ y por tanto aumento de su poder disolvente (Manaf *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2011). Como resultado, la eficiencia de extracción aumenta, aumentando así el rendimiento de aceite.

En la Figura 2.5 se observa la variación de color de aceites obtenidos a diferentes presiones. A 2,900 psi se obtuvo un aceite más oscuro comparado a las obtenidas a otras presiones. Las variaciones de color en los aceites obtenidos son debido a otros componentes ó diferencias en el contenido de ciertos compuestos extraídos. De acuerdo con Manaf *et al.* (2013), este comportamiento podría ser atribuido al contenido de citronelol, o bien también puede ser asociado al contenido de timoquinona (Grosso *et al.*,

2009). Por lo que un análisis cromatográfico acoplado a masas sería necesario para corroborar esta información.

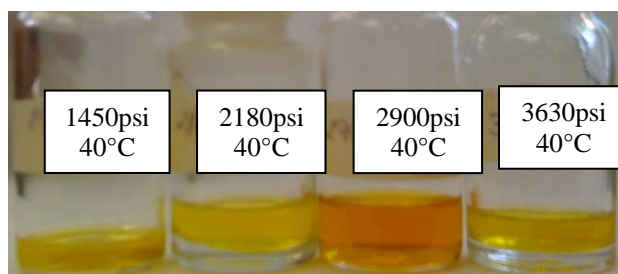


Figura 2.5. Aceite esencial de SM extraído por SFE a distintas condiciones y diluido en metanol.

Es importante recordar que, en el proceso que utiliza dióxido de carbono en estado supercrítico para extraer compuestos no polares, presenta la ventaja de no contener ningún disolvente residual, lo que podría justificar su aplicación para producir aceite más puro, siempre y cuando el valor del extracto justifique el costo de operación del equipo.

2.3.2 TPC y actividad antioxidante

IC₅₀ es un parámetro ampliamente usado para medir la eficiencia antiradicalaria, donde el valor más bajo de IC₅₀ corresponde al más alto poder antioxidante. En la Tabla 2.2 se muestra el TPC y actividad antioxidante del AE obtenido a través de HD. El aceite mostró un contenido de fenoles totales de 21.50 ± 0.18 mg_{GAE}/g_{AE}, el cual fue menor (185.5 ± 0.5 mg_{GAE}/g_{AE}) al reportado por Oke *et al.* (2009) para *S. cuneifolia*. En cuanto al poder antioxidante del AE, fue menor al mostrado por antioxidantes sintéticos. Se obtuvo un valor de IC₅₀ de $2,380 \pm 30$ µg/mL, a través del ensayo DPPH. Comparando este poder antioxidante con otras especies, fue menor al obtenido para *S. cuneifoila* (65.1 ± 2.2 µg/mL) de acuerdo con Oke *et al.* (2009) y mayor al obtenido para *S. montana* (5,490 - 18,900 µg/mL) de acuerdo a Cívar *et al.* (2008). Por otro lado, Villa-Ruano *et al.* (2015) reportaron valores de IC₅₀ de 920 – 1,460 µg/mL para la misma especie. A pesar de tratarse de la misma especie, esta diferencia puede deberse a que la actividad antioxidante depende, primero, de las condiciones genéticas y de crecimiento, tales como la calidad de la planta original, condiciones climáticas y origen geográfico, fecha de cosecha, almacenamiento y procesamiento, y en segundo lugar, del proceso de extracción y sus parámetros seleccionados (Cavéro *et al.*, 2005).

La actividad antioxidante relativa (AAR) del AE fue calculado en 40.94 ± 2.4 %. Resultados parecidos fueron observados en la misma especie ($\sim 60\%$) por la adición de 1-4 mg/mL de AE de acuerdo a Villa-Ruano *et al.* (2015).

Tabla 2.2 Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante de aceite esencial por HD

Fuente o recurso	TPC (mg_{GAE}/g_{AE})	DPPH (IC₅₀)	β-caroteno (%AAR)
AE de <i>S. macrotoma</i>	21.50 ± 0.1	$2,380 \pm 30$	40.94 ± 2.4
BHT	ND	28.45 ± 1.78	100.00

ND: No determinado

mg_{GAE}/g_{AE} : miligramos de ácido gálico equivalente por cada gramo de aceite esencial

IC₅₀: Expresado en $\mu\text{g/mL}$

Para el caso de los AE obtenidos por SFE, todos exhibieron actividad antioxidante (Tabla 2.3), sin embargo el valor más bajo de IC₅₀ (0.91 ± 0.005 mg/mL) fue obtenido a condiciones de 3630 psi y 40°C. Este valor fue mucho mejor al obtenido por HD (2.38 ± 0.036 mg/mL).

Un alto rendimiento de extracción no siempre está asociado a un mayor rendimiento de compuestos. A pesar de que a 80°C se obtuvieron los mejores rendimientos, no resultaron ser las mejores para la actividad antioxidante. Una disminución en la actividad antioxidante con el aumento de la temperatura fue observada. La temperatura es uno de los factores que más afectan a la actividad antioxidante. Generalmente el calentamiento causa una aceleración de las reacciones de iniciación y, por lo tanto, una disminución de la actividad de los antioxidantes presentes. Las mejores condiciones para obtener AE de SM con mayor actividad antioxidante fuer a 40°C y una presión de 3630 psi.

Con respecto al efecto de la presión sobre la actividad antioxidante, se puede observar que, al aumentar la presión a una temperatura constante de 40°C, mejora el poder antioxidante del aceite, siendo a 3630 psi la mejor condición de extracción.

Tabla 2.3 Actividad antioxidante (IC₅₀)^a mediante DPPH de aceites esenciales por SFE

Presión (psi)	40°C	60°C	80°C
1450	1.20 ± 0.020	2.17 ± 0.076	2.79 ± 0.289
2180	2.11 ± 0.075	3.46 ± 0.077	2.46 ± 0.096
2900	0.93 ± 0.027	1.11 ± 0.059	5.85 ± 0.532
3630	0.91 ± 0.005	ND	ND

^a concentración que inhibe el radical DPPH al 50% (mg/mL)

ND: No determinado

2.3.3 Caracterización del aceite esencial mediante GC-MS

El análisis de metabolitos del aceite esencial obtenido por HD fue realizado mediante GC-MS y en la Figura 2.6 se observa el cromatograma obtenido. El aceite de *S. macrostema* demostró un alto contenido de óxido de piperitona (14.67%) y mentona (11.31%). Otros compuestos importantes fueron espatulenol (8.29%), cariofileno (7.40%) pulegona (7.14%), linalol (5.36%), óxido de cariofileno (3.80%), biciclogermacreno (2.39%), mentol (2.07%).

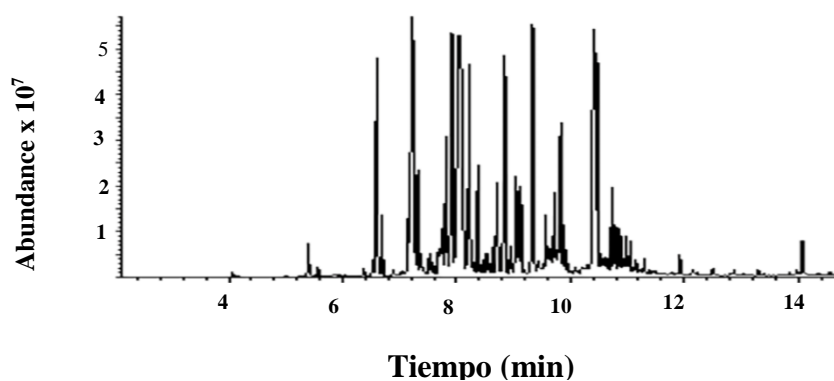


Figura 2.6. Cromatograma obtenido por GC-MS de aceite esencial de SM extraído por HD.

La composición de AE de *Satureja montana* fue cualitativamente similar y cuantitativamente diferente al obtenido en este trabajo, como se puede apreciar en la

Tabla 2.4. El estudio de Cávar y col (2008) sobre los compuestos volátiles de *S. montana* mostraron un alto porcentaje de timol (31.7%) y carvacrol (23.3%). Sin embargo estos no fueron detectados para el caso de SM.

Tabla 2.4 Perfil químico del aceite esencial de *S. macrostema*, comparado con *S. montana* y *Clinopodium macrostema*.

Pico	Tiempo de retención (min)	Compuesto	Abundancia (%)		
			<i>S. macrostema</i>	<i>S. montana</i> ^a	<i>Clinopodium macrostema</i> ^b
1	5.397	1-Octen-3-ol	0.581	0-0.6	0.4
2	6.599	Linalol	5.365	0.1-1.1	5.2
3	7.217	Mentona	11.310	-	35.3
5	7.265	Isomentona	1.389	-	0.6
6	7.321	Mentol	2.077	-	-
7	7.369	Isopulegona	0.448	-	1.2
8	7.690	(R) Citronelol	0.613	-	-
9	7.810	Desconocido	2.878	-	-
10	7.922	Pulegona	7.143	-	3.7
11	8.042	Oxido de piperitona	14.67	-	31.2
12	8.106	Desconocido	2.399	-	-
13	8.227	Desconocido	4.469	-	-
14	8.371	Desconocido	1.498	-	-
15	8.715	Eucarvona	2.114	-	-
16	8.852	Desconocido	4.718	-	-
17	9.044	(Z)-Jasmona	2.180	-	-
18	9.084	Desconocido	1.107	-	-
19	9.132	Desconocido	1.224	-	-
20	9.333	β -Cariofileno	7.407	0-2.9	1.5
21	9.573	α -humuleno	0.946	0-0.1	-
22	9.725	Germacreno D	1.313	0-1.9	-
23	9.782	Germacreno B	0.614	-	-

24	9.830	Biciclogermacreno	2.391	0-1.0	1.6
25	9.894	δ -Cadineno	0.653	0-0.2	-
26	10.415	Spatulenol	8.294	3-3.1	1.5
27	10.471	Oxido de cariofileno	3.803	5.2-7.7	-
28	10.727	Desconocido	1.224	-	-
29	10.791	Desconocido	1.107	-	-
30	10.872	α -Cadinol	0.929	0-0.5	-
31	14.078	Fitol	0.687	-	-

^a Cavar *et al.*, 2008; ^b Villa-Ruano *et al.*, 2015; -, no detectado.

Villa-Ruano *et al.* (2015) reportaron 26 compuestos volátiles en el aceite esencial de *Clinopodium macrostema* var. *laevigatum* (sinónimo de *Satureja macrostema*), siendo la mentona (35.3%) y el óxido de piperitona (31.2%). La presencia de mentona y óxido de piperitona fueron más dominantes en primavera y verano, con una disminución significativa en invierno y otoño. Interesantemente, en invierno y otoño hay un incremento de pulegona. Lo que concuerda con el bajo contenido mentona y óxido de piperitona y mayor contenido de pulegona en el AE de SM. Por lo que estos cambios son asociados a varios factores ambientales que estimularon la biosíntesis de estos volátiles.

2.3.4 Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana del AE de hojas de SM fue estudiada contra dos bacterias Gram-negativas y una Gram-positivas. Algunos de los patógenos alimentarios comunes y que son responsables de la mayoría de las enfermedades transmitidas por los alimentos son *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella enterica* (Law *et al.*, 2015). Debido a esto, y a que no existe reporte de la actividad antibacteriana contra estas cepas, se procedió a su determinación. Todas las concentraciones de AE (75,50 y 25% (w/v)), mostraron significativa actividad antibacteriana, inhibiendo el crecimiento de *E. coli*, *S. aureus* y *S. enterica* como se muestra en la tabla 2.4. Sin embargo, la bacteria Gram-positiva (*S. aureus*) fue más sensible al AE que las bacterias Gram-negativas (*E. coli* y *S. enterica*). Los diámetros de la zona de inhibición mostraron un rango entre 9.75-14.40, 8.53-11.55 y 8.30-12.6 mm para *S. aureus*, *E. coli* y *S. enterica*, respectivamente. Con un

incremento en la concentración de AE, un incremento en la zona de inhibición fue observado. La concentración más alta de AE (75%) mostró la más alta actividad contra el microorganismo probado, en comparación con la concentración de AE más bajo (25%).

Las zonas de inhibición de la eritromicina (como control positivo) fueron mayores, a las presentadas por el AE contra las tres cepas. De acuerdo con los valores de CMI y CMB, las bacterias gram-negativa fueron más resistentes al AE, concordando con los datos anteriores. Los valores obtenidos de CMI y CMB fueron 2.5 y 5 mg/mL respectivamente para *E. coli*, *S. enterica*, y de 1.25 y 2.5 mg/mL para *S. aureus* respectivamente.

Tabla 2.4 Potencial antibacterial de aceite esencial de *Satureja macrostema*, evaluado usando método difusión de disco en agar y macrodilución en caldo (CMI y CMB)

Bacteria	Diámetro promedio \pm DE de halo de inhibición (mm)				CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)
	75% AE	50% AE	25% AE	ER		
<i>E. coli</i> (-)	11.55 \pm 0.49	9.20 \pm 0.02	8.53 \pm 0.15	19.3 \pm 1.03	2.5	5
<i>S. enterica</i> (-)	12.6 \pm 0.43	10.2 \pm 0.50	8.30 \pm 0.51	18.1 \pm 0.55	2.5	5
<i>S. aureus</i> (+)	14.40 \pm 0.14	11.36 \pm 0.46	9.75 \pm 0.49	20.65 \pm 0.07	1.25	2.5

AE: aceite esencial de *Satureja macrostema*

ER: Eritromicina (15 μ g/disco)

2.3 Conclusiones del Capítulo II

- El rendimiento de aceite obtenido por SFE fue mayor (0.1162-1.0625 % (w/w)) al obtenido por HD (0.1078% w/w).
- El aceite obtenido por HD mostró un contenido de fenoles totales de 21.50 \pm 0.18 mg_{GAE}/g_{AE}, un valor de IC₅₀ de 2,380 \pm 30 μ g/mL, a través del ensayo DPPH y actividad antioxidante relativa (AAR) de 40.94 \pm 2.4 % mediante el ensayo de β -caroteno.
- Las mejores condiciones para obtener AE por SFE con mayor actividad antioxidante fueron a 40°C y una presión de 3630 psi (IC₅₀=0.91 \pm 0.005mg/mL).
- Los principales compuestos identificados del AE obtenido por hidrodestilación fueron: óxido de piperitona (14.67%) y mentona (11.31%), seguido de espatulenol

(8.29%), cariofileno (7.40%) pulegona (7.14%), linalol (5.36%), óxido de cariofileno (3.80%), biciclogermacreno (2.39%), mentol (2.07%).

- Los resultados obtenidos muestran que el AE de *S. macrostema* es una una rica fuente de antioxidantes.
- El AE presentó significativa actividad antibacterial, teniendo mayor efecto sobre *S. aureus* (Gram-positiva).
- El AE exhibió una inhibición del crecimiento dependiente de la concentración con el método de difusión de disco.
- La propiedad antibacteriana del AE podría considerarse como un factor adicional de promoción de la salud.
- Las propiedades antioxidantes y antibacterianas indican que esta planta tiene potencial para uso en aromaterapia y en la farmacología.

CAPÍTULO III

**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
NANOEMULSIONES SIMPLES DE TIPO W/O Y O/W
CONTENIENDO BIOACTIVOS DE *Satureja macrostema***

3.1 Marco teórico

Una emulsión consiste de dos líquidos inmiscibles (usualmente aceite y agua), con uno de los dos líquidos disperso en forma de pequeñas gotas esféricas en el otro. El diámetro promedio de las gotas en productos alimenticios emulsificados típicamente son de un rango de 0.1 to 100 μm . Las emulsiones pueden ser convenientemente clasificadas de acuerdo a la distribución espacial relativa de las diferentes fases. Una emulsión que consiste de gotas de aceite dispersados en una fase acuosa es referido como una emulsión aceite en agua (O/W), por ejemplo: leche, crema, mayonesa, bebidas, sopas y salsas. Por el contrario, una emulsión que consiste en gotas de agua dispersadas en una fase oleosa se refiere a una emulsión agua en aceite (W/O), por ejemplo, mantequilla, margarina, y untables (Mc Clements, 2007; Piorkowski & Mc Clements, 2014). Dependiendo del tamaño de gotas dispersadas las emulsiones pueden ser clasificadas en: macroemulsiones (1.5-100 μm), nanoemulsiones (50-500 nm) y microemulsiones (3-50 nm) (Figura 3.1).

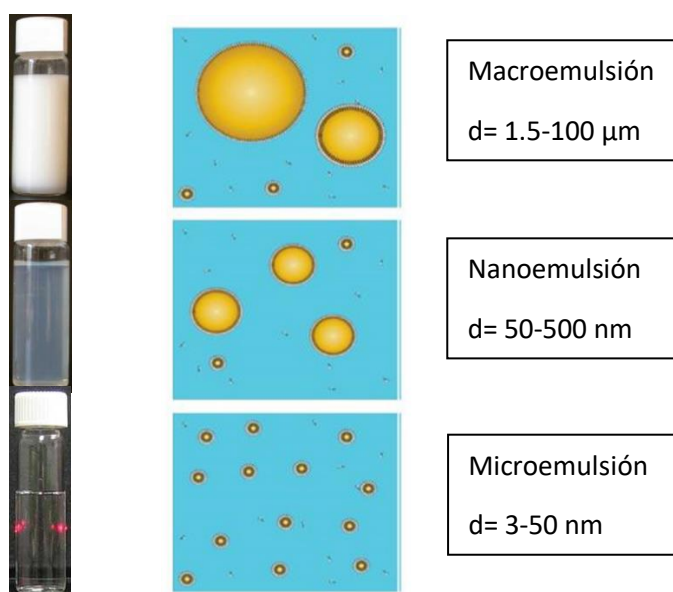


Figura 3.1. Representación esquemática de clasificación de emulsiones (basado en Piorkowski & McClements, 2014).

Las emulsiones y nanoemulsiones son sistemas termodinámicamente inestables que tienden a romperse con el tiempo a través de una variedad de mecanismos fisicoquímicos (Figura 3.2) incluyendo separación gravitacional (cremado/sedimentación), floculación, coalescencia, Ostwald ripening e inversión de fase (Piorkowski & Mc Clements, 2014). En años recientes se ha estudiado el uso de nanoemulsiones, también referidas en la literatura como miniemulsiones (El-Aasser & Sudol, 2004), nanoemulsiones (Tadros *et*

al., 2004), emulsiones ultrafinas (Nakajima, 1997) y emulsiones submicron (Amselem & Friedman, 1998).

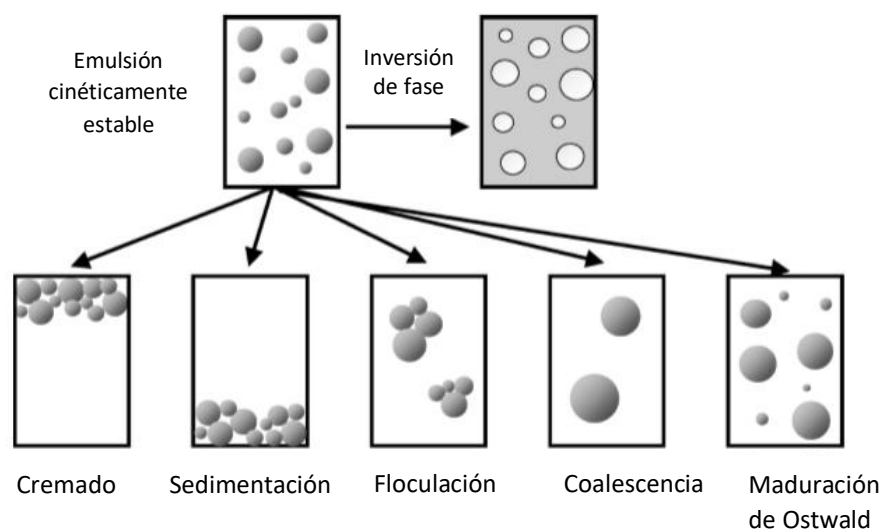


Figura 3.2. Mecanismo de inestabilidad de una emulsión (Mc Clements, 2007).

Los emulsificantes juegan un papel importante en el desarrollo de nanoemulsiones, ya que facilitan la formación de pequeñas gotas durante la homogenización por adsorción de la interfaz aceite-agua y reduciendo la tensión interfacial (Figura 3.3a), así como proteger las gotas de la agregación después de su formación por generación de interacciones repulsivas (usualmente estéricas o electrostáticas) entre las gotas (Figura 3.3b; Bai *et al.*, 2016). Muchos de los emulsificantes industrialmente usados para la estabilización de emulsiones son tensoactivos sintéticos tales como tweens y spans; y emulsificantes de origen animal tales como gelatina, proteína de huevo, proteína de suero de leche y caseinatos (Mc Clements & Gumus, 2016).

El monooleato de polioxietilen (20), sorbitano (Tween 80) y el sorbitán monooleato (Span 80) se usan comúnmente como surfactantes seguros debido a su alto grado de compatibilidad con otros ingredientes y baja toxicidad. Span 80 es un agente emusificante líquido viscoso y lipófilo. Tween 80, es de naturaleza hidrófila, es un derivado de Span 80 y es más soluble en agua que en aceite. Para obtener una nanoemulsión estable se tienen que equilibrar las propiedades hidrófilas y lipófilas de las fases involucradas. Estos tensoactivos no iónicos, no se ven afectados por ningún cambio de pH de la mezcla (Shahavi *et al.*, 2015). Debido a lo anterior, el Span 80 y Tween 80 fueron elegidos y

combinados para estabilizar una nanoemulsión W/O en el cual se incorporó el extracto acuoso de SM.

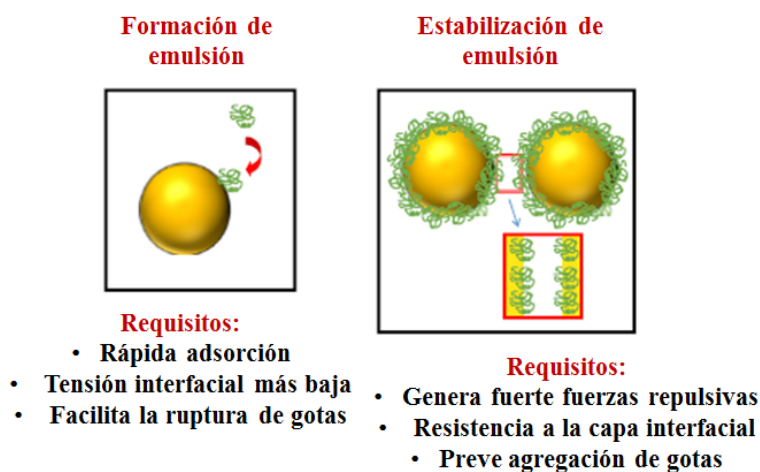


Figura 3.3. Papeles que juegan los emulsificantes en la producción de productos comerciales basados en emulsión: (a) facilitan la formación de la emulsión y (b) favorecen la estabilidad de la emulsión (McClements & Gumus, 2016).

Por otra parte, el WPI es un emulsificante natural basado en proteína y que es ampliamente usado en la industria de alimentos. Contiene una mezcla de proteínas globulares que típicamente forman una relativa capa delgada alrededor de las gotas lipídicas, así que la repulsión estérica entre ellas es relativamente de corto alcance. Como consecuencia, el principal mecanismo que inhibe la agregación de gotitas de aceite recubiertas de WPI suele ser la repulsión electrostática (en lugar de la repulsión estérica), lo que significa que este tipo de emulsión es particularmente sensible al pH y la fuerza iónica (Bai *et al.*, 2016). En este capítulo se empleará el WPI como emulsificante para la formación de una nanoemulsión que contiene al aceite esencial de SM.

Las nanoemulsiones son dispersiones líquido-en-líquido cinéticamente estables, con tamaños de gota del orden de los 100 nm. Esta propiedad de tamaño pequeño les confiere diversas propiedades funcionales como grandes áreas superficiales por unidad de volumen, estabilidad alta, apariencia óptica translúcida y un comportamiento reológico modulable. Debido a estas características, las nanoemulsiones presentan una gran variedad de aplicaciones potenciales en diversas áreas como la liberación de compuestos con actividad biológica, alimentos, cosméticos y materiales de síntesis. Además de que

este tipo de sistemas se ha utilizado como modelos para la comprensión del comportamiento de los sistemas coloidales en escala nanométrica.

Al igual que las emulsiones convencionales, una nanoemulsión contiene aceite, agua y un emulsificante. La adición del emulsificante es crítica para la creación de las pequeñas gotas formadas debido a la reducción en la tensión interfacial y a la contribución que puede aportar a la estabilidad de la nanoemulsión debido a interacciones electrostáticas e impedimento estérico. Como se mencionó anteriormente, generalmente los emulsificantes más utilizados para este fin son los tensoactivos, sin embargo en la actualidad se ha estudiado el efecto de las proteínas y lípidos sobre la formación y estabilización de sistemas en escala nanométrica.

Los métodos para la preparación de nanoemulsiones incluyen dos tipos: a) emulsificación de alta energía y b) emulsificación de baja energía. El método de emulsificación de alta energía incluye: agitación de alta energía, emulsificación ultrasónica, homogenización a alta presión, microfluidización y emulsificación con membranas. Los métodos de emulsificación de baja energía incluyen: temperatura de inversión de fases, punto de inversión de emulsión y emulsificación espontánea (Jaiswal *et al.*, 2015).

La microfluidización es un método ampliamente usado y altamente eficiente para la producción de nanoemulsiones. Microfluidizadores convencionales típicamente un procedimiento de dos pasos para obtener una nanoemulsión: a) se crea una emulsión gruesa utilizando un homogenizador de alta velocidad, b) esta gruesa emulsión fluye a través de los microcanales sobre un área de impacto que resulta en partículas muy finas de rango submicrónico (Figura 3.4; Bai *et al.*, 2016). Este método será aplicado para la obtención de emulsiones O/W, donde el tamaño del conjunto proteico que conforma el WPI es utilizado como agente estabilizante.

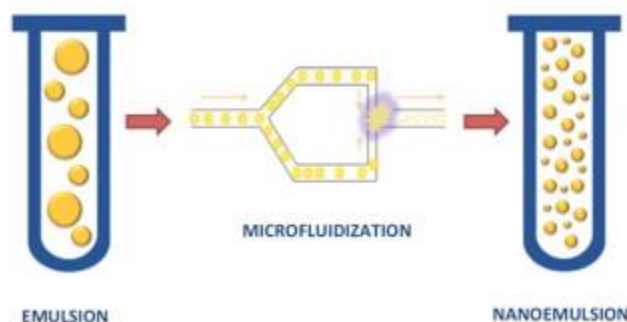


Figura 3.4. Esquematación de la obtención de nanoemulsión utilizando microfluidización.

La emulsificación espontánea es usualmente implementado por titulación de una fase orgánica (aceite + tensoactivo) en un recipiente conteniendo una fase acuosa. Finas gotas de aceite (<10 nm) pueden ser formadas si tanto la composición del sistema (tensoactivo y tipo de aceite) y las condiciones de preparación (temperatura, velocidad de agitación, velocidad de adición) son optimizadas. Un mecanismo propuesto para SE es la formación de un bicontinuo microemulsión en el límite donde lo orgánico y acuoso las fases entran en contacto, lo que conduce a la generación espontánea de gotitas de aceite fino cuando la fase de la microemulsión bicontinua se rompe (Figura 3.5).

Este proceso puede ser afectado por una variedad de factores incluyendo condiciones de preparación, composición del aceite, tipo de tensoactivo, concentración de tensoactivo, co-solventes, co-tensoactivos y composición del sistema. Estudios previos han demostrado que la adición de co-solventes (como alcoholes y polioles) puede influir en gran medida en la formación y las propiedades de los sistemas basados en emulsiones (Komaiko & McClements, 2016). Por lo que en este capítulo, se observará la influencia de diferentes cantidades de alcohol sobre la estabilidad de emulsiones W/O mediante el método de emulsificación espontánea en la presencia de diferentes cantidades de alcohol.

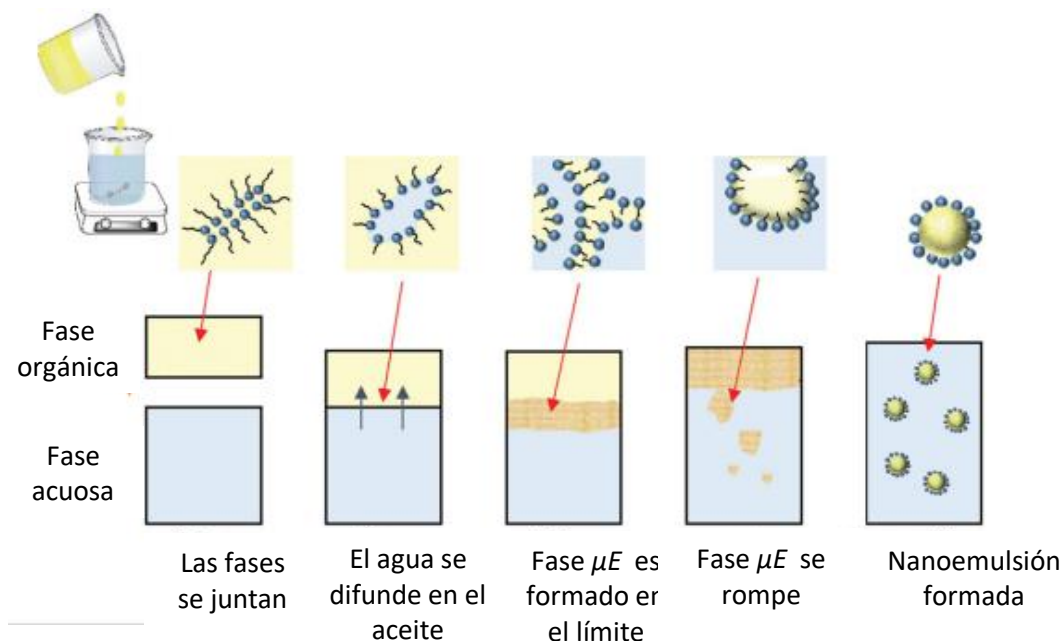


Figura 3.5. Diagrama esquemático del mecanismo de formación de nanoemulsiones por el método de emulsificación espontánea. Cuando la fase orgánica (aceite+ tensoactivo hidrofílico) y fase acuosa (agua) son puestos en contacto y una microemulsión bicontinua (μE) es formada en el límite, el cual se rompe y forma pequeñas gotas de aceite.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Reactivos

Los tensoactivos Tween 80 y Span 80 fueron obtenidos de Sigma Aldrich; el aislado de proteína de suero de leche (WPI; Hilmar 9410; 98% proteína b.s.) fue obtenida de Hilmar Food International, el aceite mineral grado alimenticio se empleó como fase oleosa para las nanoemulsiones W/O.

3.2.2 Preparación de nanoemulsiones W/O por emulsificación espontánea

La mezcla de tensoactivos no iónicos (Tween 80: Span 80 (1:3)) fue mezclado con el aceite mineral. Posteriormente la fase acuosa constituida por el extracto acuoso de SM (MUA_{E100-30min}; 5% w/w) fue adicionada a la fase oleosa bajo agitación magnética (Figura 3.6) durante 10 min.



Figura 3.6. Emulsificación espontánea de emulsión W/O.

3.2.3 Efecto del co-solvente y tensoactivo

Para determinar el efecto del incremento de concentración de la mezcla de tensoactivos y etanol, como co-solvente ó co-tensoactivo, sobre la formación y estabilidad de las NE W/O, se utilizaron concentraciones de etanol de 10 y 50% (p/p) , así como diferentes relaciones extracto/tensoactivo (0.43, 0.6, 0.7 y 0.94; ver Tabla 3.1)

Tabla 3.1 Diseño experimental utilizado para la elaboración de nanoemulsiones W/O conteniendo extracto de *Satureja macrostema*.

Formulación	Extracto % (w/w)	Mezcla de tensoactivos % (p/p)	Aceite mineral % (p/p)
F11	5% disuelto en 10% de etanol	11.63	83.37
F12	5% disuelto en 10% de etanol	8.33	86.67
F13	5% disuelto en 10% de etanol	6.49	88.51
F14	5% disuelto en 10% de etanol	5.32	89.68
F51	5% disuelto en 50% de etanol	11.63	83.37
F52	5% disuelto en 50% de etanol	8.33	86.67
F53	5% disuelto en 50% de etanol	6.49	88.51
F54	5% disuelto en 50% de etanol	5.32	89.68

3.2.4 Obtención de nanoemulsión O/W

3.2.4.1 Preparación de emulsión gruesa

Para la obtención de las nanoemulsiones tipo O/W, la fase acuosa consistió en WPI al 2% el cual fue hidratado durante 4 horas bajo agitación previo a la adición del aceite esencial de SM.

En un tubo Corning se colocó la fase del WPI en un baño con hielo. Posteriormente, la fase oleosa (AE; 1% de la emulsión) fue adicionado gota a gota a mínima velocidad en un Ultra-Turrax T10 basic marca IKA® (Figura 3.7), una vez adicionado completamente, la velocidad se llevó a 11,000 rpm y se mantuvo durante 5 min. A la emulsión resultante se denominó como emulsión gruesa.



Figura 3.7. Ultra-Turrax Modelo T10 basic, IKA® utilizado para la formación de una emulsión gruesa.

3.2.4.2 Microfluidización

Una vez obtenida la emulsión gruesa, ésta se sometió a microfluidización en un Nano DeBee (Figura 3.8) y fue sometida a 5 ciclos de microfluidización a una presión de 15,000 psi y temperatura controlada de 25°C.

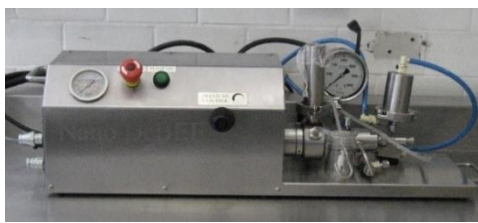


Figura 3.8. Microfluidizador Nano DeBee utilizado para la formación de NEs.

3.2.4.3 Caracterización de las NEs

3.2.4.3.1 Diámetro hidrodinámico

La medición del diámetro hidrodinámico e índice de polidispersidad (PDI) de las NE fue realizada por la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS) usando un Zetasizer Nano-ZS2000 (Malvern Instruments Ltd. Malvern, Worcestershire, U.K.) (Figura 3.9). En algunos casos las NE obtenidas fueron diluidas en las respectivas fases continuas para poder efectuar la medición, propiedades como viscosidad e índice de refracción fueron determinados previamente.



Figura 3.9. Zetasizer utilizado para determinar radio hidrodinámico de gota de NEs.

3.2.4.3.2 Potencial zeta

El potencial- ζ de las NE tipo O/W fue medido usando Zetasizer (Figura 3.3). Las muestras de emulsiones fueron diluidas en agua desionizada a una relación de 1:4 (v/v) y colocadas dentro de la celda de medición.

3.2.4.3.3 Turbidez

La turbidez de las NE fue analizado por medición de absorbancia a 600 nm, usando un espectrofotómetro UV-visible GENESYS 2 de acuerdo con la metodología descrita por Saberi *et al.* (2013).

3.2.4.3.4 Estabilidad de NEs

El diámetro hidrodinámico, el PDI, potencial zeta y absorbancia de las NE fueron monitoreados durante un mes de almacenamiento (Moghimi *et al.*, 2016), con la finalidad de evaluar los cambios fisicoquímicos presentes en estos sistemas. Por otra parte, se evaluó el método basado en la centrifugación de las muestras para acelerar la presencia de fenómenos de inestabilidad como sedimentación, floculación o cremado, de acuerdo con el método descrito por Cuevas-Bernardino *et al.* (2016), usando un LUMisizer (LUM GmbH, Berlín, Alemania; Figura 3.10). Cada muestra de NE (0.4 mL) fue sometida a una

velocidad rotacional de 2,000 rpm, durante 2 h a 25 °C. Cerca de 250 mediciones fueron determinadas a intervalos de tiempo de 30 s. Las gráficas de transmisión normalizada (%) contra posición (mm) fueron obtenidas y la velocidad de cremado (% transmisión integrada/h) obtenida de las pendientes.



Figura 3.10. Equipo lumisizer utilizado para determinar estabilidad de NEs.

3.2.4.3.5 Actividad antioxidante

Para evaluar la actividad antioxidante de la emulsión conteniendo extracto de SM, la fase acuosa (extracto etanólico) fue separado de la fase continua. A 5g de nanoemulsión se le adicionó 5 mL de etanol, se agitó en un Vortex por 1 min y después se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue evaluado por el ensayo DPPH como en el capítulo I.

3.3 Resultados y discusiones

En capítulos anteriores se demostró que los extractos etanólicos de SM presentaron actividad antioxidante debido a la presencia inherente de compuestos fenólicos. Sin embargo, la aplicación directa de estos extractos aún representa desventajas debido a bajas biodisponibilidades de los extractos crudos durante su paso por el tracto gastrointestinal. En este sentido, las NEs representan una alternativa para contrarrestar estas desventajas, ya que por sus tamaños tan pequeños las resistencias al transporte a través de las células se ve reducido y por lo tanto se potencia la entrega de los componentes bioactivos contenidos.

Debido a que las NE tipo W/O fueron estabilizadas mediante el uso de agentes tensoactivos, es bien sabido que la presencia de alcoholes mejora las propiedades funcionales de estos, actuando como agentes co-tensoactivos o co-solventes sobretodo en

los procesos de emulsificación espontánea. Por tal motivo en este trabajo se contempló evaluar el efecto del etanol sobre la formación espontánea de las NEs.

3.3.1 Efecto del contenido de co-tensoactivo y tensoactivo

Los co-tensoactivos son usualmente utilizados en conjunto con los tensoactivos debido a que la mayoría de los tensoactivos de cadena simple son incapaces de reducir la tensión en la interface del aceite y agua para formar una microemulsión. Los co-tensoactivos más comunes son alcoholes de cadena media, los cuales reducen la tensión y aumentan la fluidez de la interface aceite-agua, aumentando así la entropía del sistema. Estos alcoholes de cadenas medianas incrementan la movilidad de la región de la cola no polar de los tensoactivos, lo que permite una mayor penetración de las moléculas de aceite, por lo tanto, estabiliza el sistema y facilitan la formación de una microemulsión (Lee, 2011).

El etanol fue seleccionado por ser un disolvente clasificado con baja toxicidad, así como para incrementar la solubilidad de compuestos bioactivos del extracto etanólico de *S. macrostema* (Capítulo I).

La concentración de tensoactivo y co-tensoactivo puede determinar el tamaño de gotas que afecta a la estabilidad de las propiedades físicas de una NE (Elfiyani *et al.*, 2017). Como se observa en la Figura 3.11, al aumentar la concentración de etanol se obtuvieron emulsiones más claras y/o traslúcidas, debido a la reducción de la tensión interfacial entre la fase dispersa y continua, lo que facilitó la ruptura de gotas dentro de la zona de homogenización (Zeeb *et al.*, 2014). Reflejándose en el tamaño de gota de las emulsiones (Figura 3.12).

En la Figura 3.12 se puede apreciar que las formulaciones F11 y F12 a los 21 días presentaron inestabilidad debido a la presencia de sedimentación, del mismo modo las formulaciones F13 y F14 presentaron inicio de inestabilidad por precipitado a los 21 días, haciendo estas cuatro emulsiones inestables.

Este aumento de diámetro hidrodinámico probablemente es debido a una coalescencia; y posteriormente se observa una disminución que puede ser atribuida a la ruptura y separación de las fases.

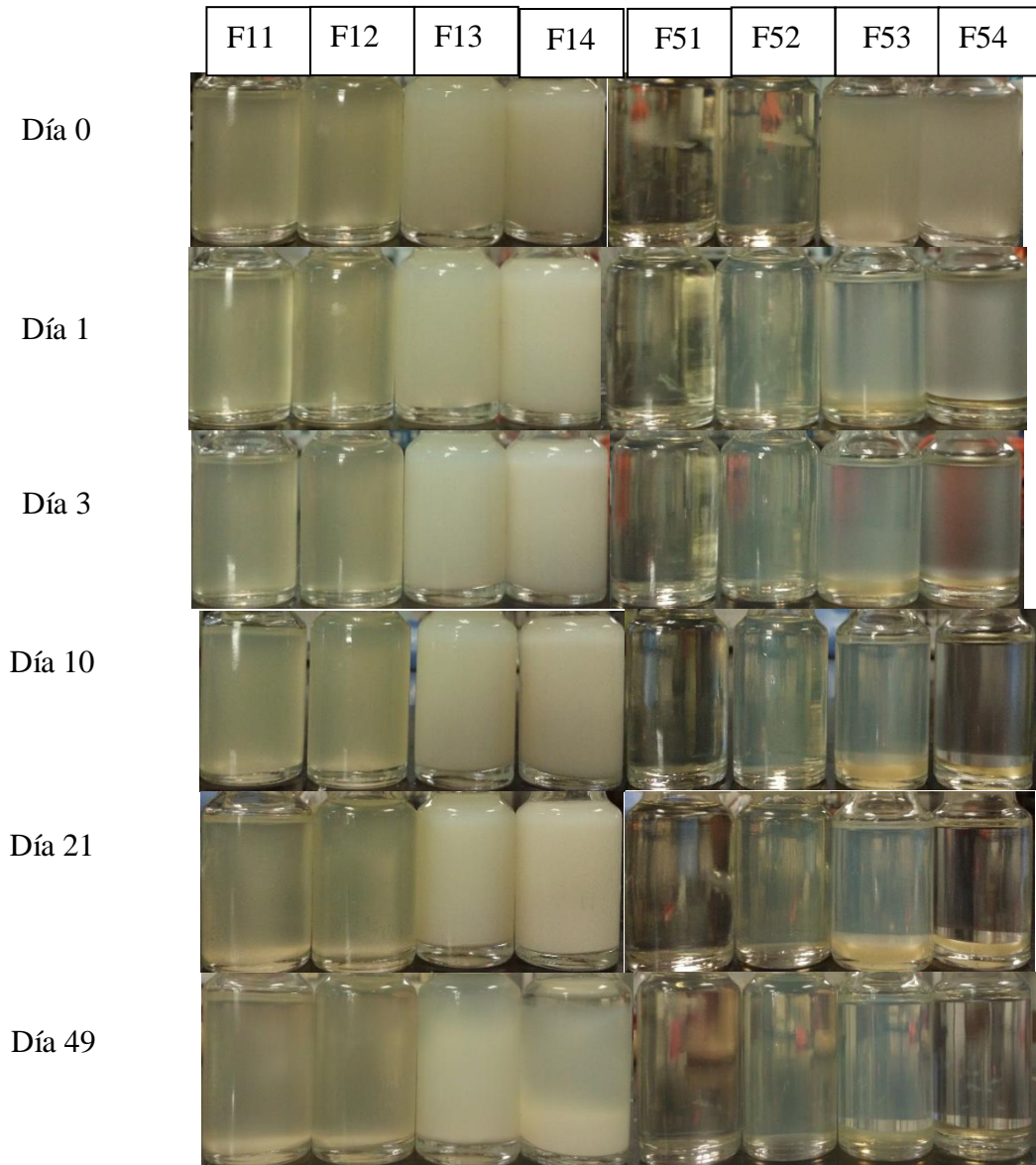


Figura 3.11. Estabilidad física de NEs W/O con diferentes contenidos de tensoactivos y etanol.

Para el caso de las NEs, formulaciones F53 y F54, bastó solo 1 día de almacenamiento para que presentaran separación visual de fases.

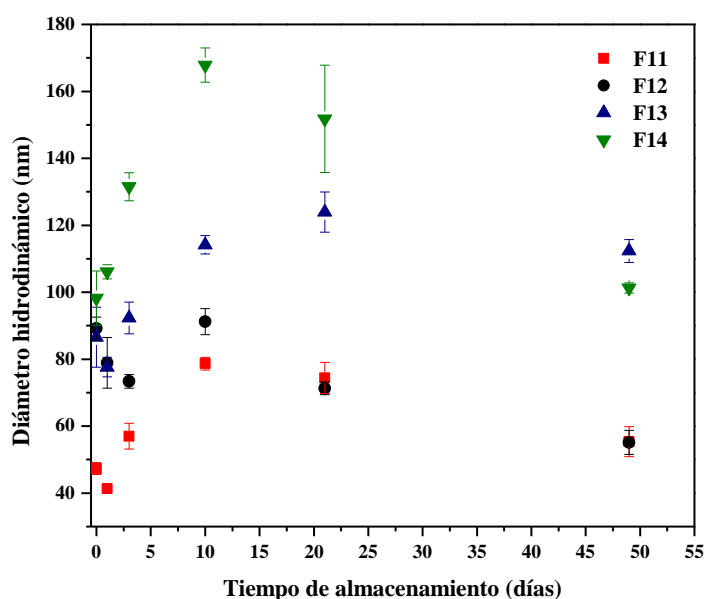


Figura 3.12. Diámetro hidrodinámico de gota de NEs con extracto etanólico de *S. macrostema* al 10% a diferentes concentraciones de tensoactivos.

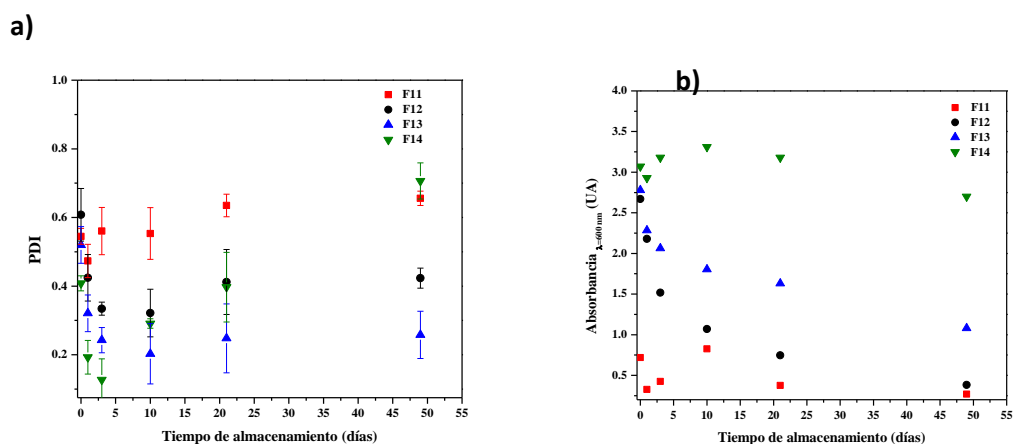


Figura 3.13. Estabilidad de NEs con extracto etanólico de *S. macrostema* al 10%; a) PDI y b) absorbancia.

Con respecto al tamaño de gota (Figura 3.14) un ligero descenso del tamaño de gota fue observado, probablemente debido a un acomodamiento ó a la evaporación de etanol. Sin embargo, debido a que F52 contiene menor cantidad de tensoactivo (<10%), se eligió esta formulación para la caracterización de la emulsión extracto etanólico de SM en aceite (W/O) en diferentes condiciones de almacenamiento.

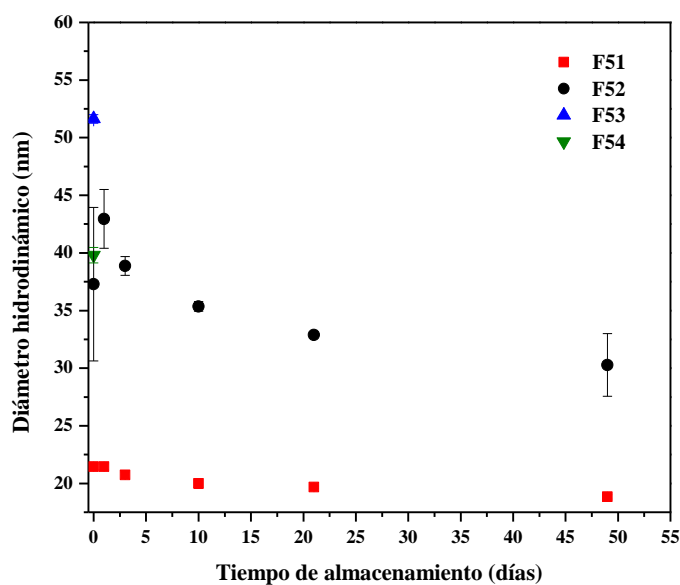


Figura 3.14. Radio hidrodinámico de gota de NEs con extracto etanólico de *S. macrostema* al 50% a diferentes concentraciones de tensoactivos.

Por lo que la concentración de la combinación de tensoactivos no fue suficiente para reducir la tensión interfacial entre el aceite y el agua. En F51 y F52 fueron los únicos que no presentaron cambios físicos por examinación visual a los 49 días de almacenamiento a temperatura ambiente, lo cual se confirma en la Figura 3.15, al no presentarse variación del PDI y absorbancia.

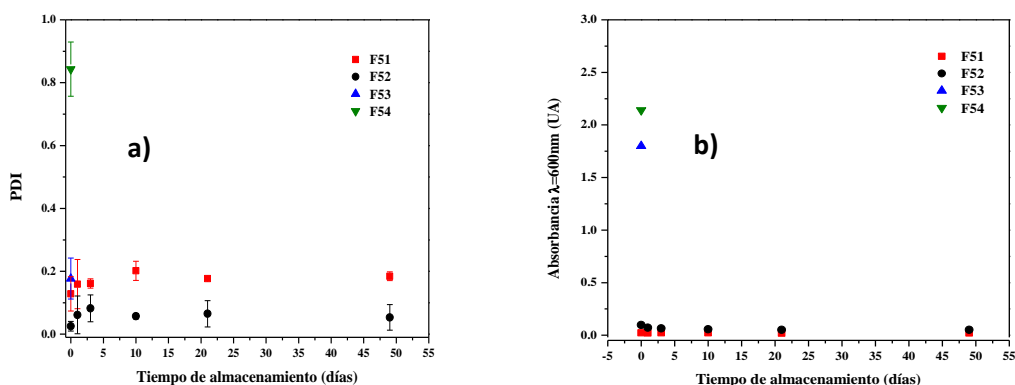


Figura 3.15. Estabilidad de NEs con extracto etanólico de *S. macrostema* al 50%; a) PDI y b) absorbancia.

3.3.2 Estabilidad a la sedimentación de NEs W/O

La estabilidad física de la NE F52 fue observada mediante fuerza centrífuga, la cual fue expresada como perfiles de transmisión normalizada a intervalos de tiempo sobre la longitud de la muestra (Figura 3.16a). La estabilidad de la NE puede ser cuantitativamente descrita por la integración de los perfiles de transmisión normalizada con respecto al tiempo de medición. La pendiente de la curva resultante está directamente relacionada con la estabilidad, en donde valores altos de la pendiente representa inestabilidad (Petzold *et al.*, 2009). Para el caso de la NE F52 no se observó alguna pendiente, comprobándose que tienen una buena estabilidad (Figura 3.16b).

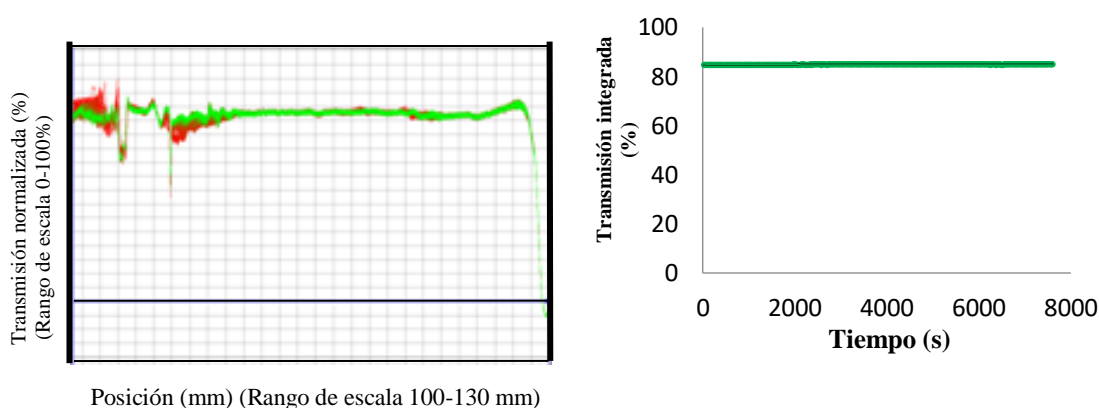


Figura 3.16. Estabilidad a la sedimentación; a) evolución de perfiles de transmisión normalizada de NE W/O, b) Transmisión integrada contra tiempo de NE W/O.

3.3.3 Estabilidad de almacenamiento de NEs W/O

La estabilidad de almacenamiento fue desarrollada manteniendo la muestra a temperatura de refrigeración ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) y a temperatura ambiente ($27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Estos estudios fueron desarrollados por un periodo de 1 mes. El tamaño de gota, índice de polidispersidad y turbidez fueron determinados durante el almacenamiento.

Como se puede apreciar en la Figura 3.17, el radio hidrodinámico se redujo con el paso del tiempo en las dos condiciones de almacenamiento, aunque fue más notorio el efecto a 27°C . Durante el proceso de emulsificación los tensoactivos se adsorbieron rápidamente en la interfase, y debido a la diferencia de afinidad de los tensoactivos utilizados, estos se acomodan de forma aleatoria en la superficie de la gota y no se llega a cubrir por completo la superficie de la gota, habiendo mayor tamaño de gota comparados a tiempos largos de almacenamiento. Es decir, conforme el paso del tiempo hay un reacomodo de las

moléculas de tensoactivos, logrando alinearse, y de esta forma se pudo haber reducido el tamaño de la gota. Aunado a esto, la disminución del tamaño de gota a 27°C pudo haber afectado a la viscosidad del aceite y la movilidad de los tensoactivos al reacomodo, por esta razón, la reducción de tamaño de gota a 27°C fue significativamente mayor.

Las NEs tuvieron valores de índice de polidispersidad (PDI) por debajo de 0.2 durante el periodo de prueba (Figura 3.17), indicando alta fidelidad del sistema (baja polidispersidad), el cual puede reflejar la buena estabilidad de esta formulación. Valores cerca de 1.0 son indicativo de un sistema polidisperso (Bernardi *et al.*, 2011).

La turbidez de una emulsion es una función del tamaño de gota y concentración. Además, el cambio de turbidez indica el cambio del tamaño de gota y concentración con el tiempo (Li & Lu, 2016). Como se puede observar en la Figura 3.17 la turbidez representada por la absorbancia, disminuyó debido a la reducción del tamaño de las gotas con el tiempo pasaron los días.

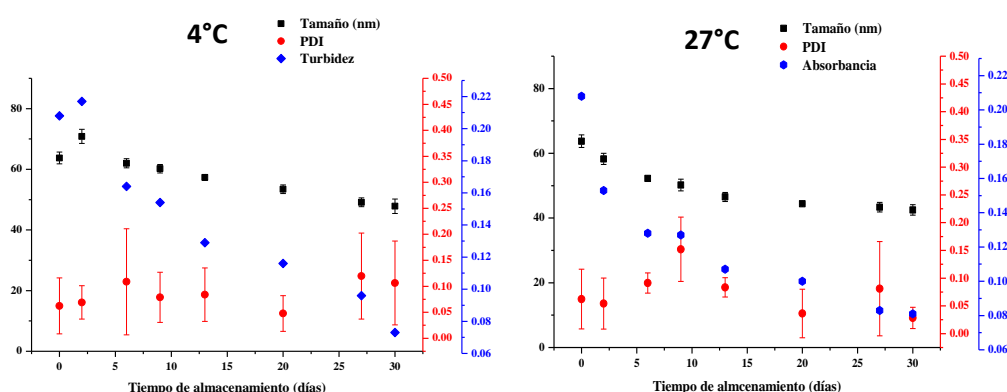


Figura 3.17. Estabilidad de NEs almacenadas a 4°C y 27°C.

3.3.3 Actividad antioxidante de NEs W/O

Esta medición fue desarrollada para entender la influencia de un extracto emulsificado sobre la protección de la actividad antioxidante al ser comparado con un extracto libre.

Los datos fueron normalizados basados en la concentración del día 0 y se representan en la Figura 3.18. Después de 20 días de almacenamiento las NEs no mostraron diferencia significativa en ambas condiciones de almacenamiento, por lo que la temperatura al

parecer no tuvo efecto sobre la actividad. Por el contrario, el extracto etanólico sí fue afectado por la temperatura de almacenamiento, siendo mayor la pérdida de actividad a 27°C que a 4°C (Figura 3.18).

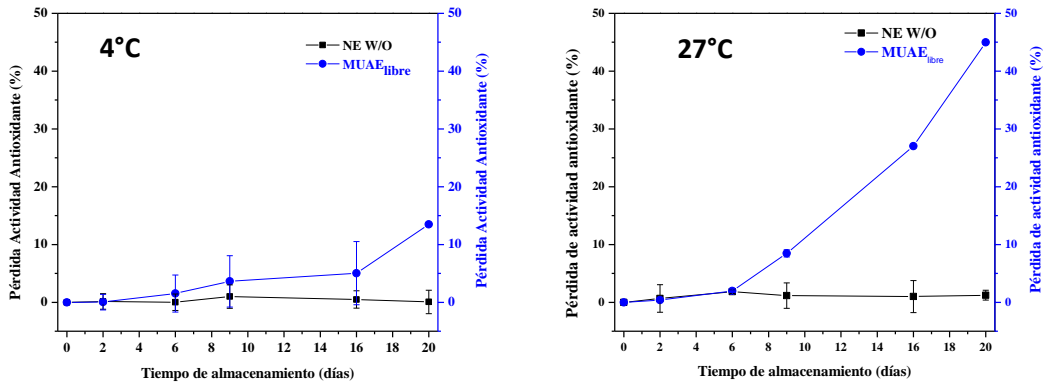


Figura 3.18. Pérdida de actividad antioxidante de NEs almacenadas a 4°C y 27°C.

3.3.4 Estabilidad al cremado de NEs O/W

La estabilidad al cremado de la NEs formado con WPI se mostró como perfil de transmisión relacionada con el espacio y tiempo sobre la muestra de emulsión. A mayor cambio de perfiles de trasmisión con la centrifugación, es menos estable una emulsión. Como se puede observar en la Figura 3.19, la fase acuosa más densa y transparente se movió hacia abajo, lo que dio una transmisión más alta; la fase oleosa más ligera y menos transparente se trasladó hacia arriba, mientras que una capa de cremado se observa como un canal debido a su baja transparencia.

Esto se pudo confirmar por examinación visual de la muestra después de la medición (Figura 3.20). La estabilidad al cremado pudo ser reflejado graficando la integración de perfiles & el tiempo de medición. Se obtuvo una pendiente de $1.10 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, que comparado con otros trabajos resulta tener estabilidad moderada.

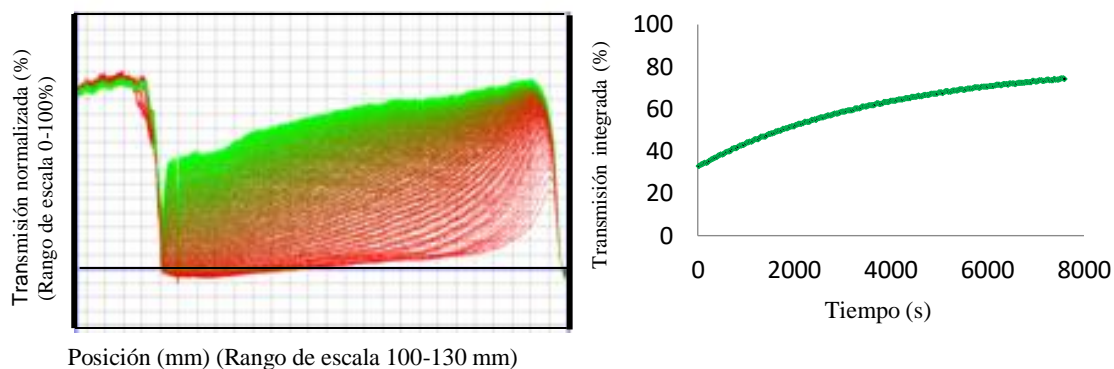


Figura 3.19. Estabilidad al cremado; a) Evolución de perfiles de transmisión normalizada de NE O/W, b) Transmisión integrada contra tiempo de NE O/W.



Figura 3.20. Emulsión O/W después de centrifugación en el lumisizer.

3.3.6 Estabilidad de almacenamiento de NEs O/W

El potencial zeta inicial fue de aproximadamente -36.75 mV. Sistemas con potencial zeta $>+30$ ó <-30 mV son usualmente consideradas como estables debido al incremento de fuerzas repulsivas entre las gotas contra la floculación y coalescencia predominante en las NEs. La carga negativa tiene muchas explicaciones, una de ellas el grado de disociación y número de compuestos ionizables del AE (Li & Lu, 2016). Como se aprecia en la figura 3.21 a los 25 días hay una disminución de la carga en las NEs almacenadas a 4°C y 27°C , dando indicio de inicio de desestabilización corroborado con el aumento de tamaño de gota.

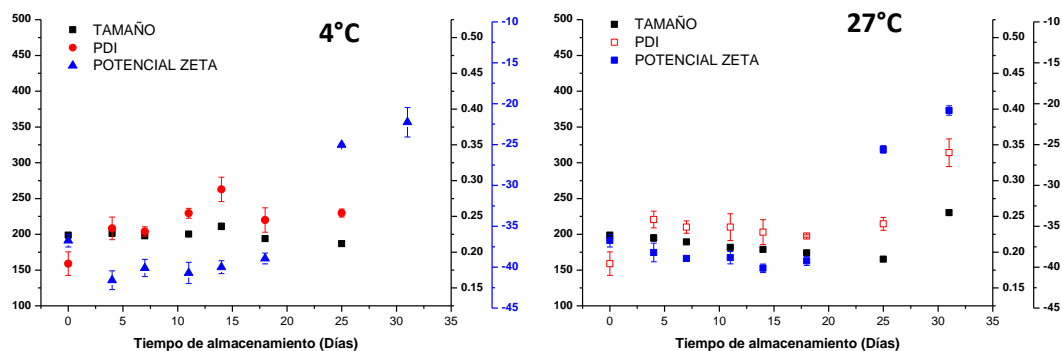


Figura 3.21. Estabilidad de NEs almacenadas a 4°C y 27°C.

3.3.7 Actividad antioxidante de NEs O/W

Los datos fueron normalizados basados en la concentración del día 0 y se representan en la figura 3.22. Los datos mostraron que la pérdida de actividad antioxidante resultó ser menos severa en NEs estabilizadas con WPI que el del extracto libre en ambas condiciones de almacenamiento. Sin embargo, la temperatura afectó la velocidad de pérdida de actividad a 27°C.

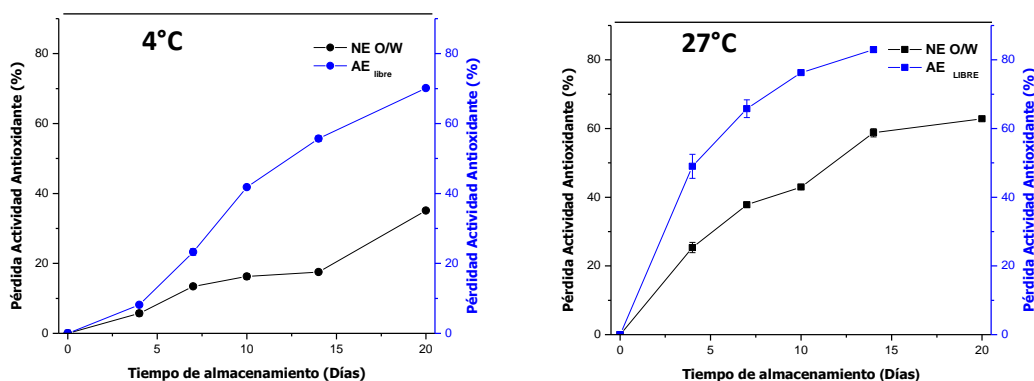


Figura 3.22. Pérdida de actividad antioxidante de NEs almacenadas a 4°C y 27°C.

3.4 Conclusiones del capítulo III

- Se pudo observar que las NEs tipo W/O fueron influenciadas por la concentración de etanol, encontrando que el diámetro hidrodinámico de las gotas disminuyó conforme la concentración de etanol se elevaba, lo cual fue atribuido a la modificación inducida sobre los tensoactivos no iónicos en términos de su solubilidad y curvatura óptima al momento de formar la NE.

- Las NEs obtenidas presentaron buena estabilidad durante el almacenamiento (física y químicamente), además exhibieron buena resistencia ante las pruebas de desestabilización acelerada a través de la centrifugación de las mismas.
- El diámetro hidrodinámico de las gotas de las NEs presentó una reducción al cabo del tiempo de almacenamiento a ambas temperaturas (4 y 27°C), esto puede deberse a fenómenos de reacomodo-interacciones presentes en la mezcla de tensoactivos adsorbidos en las interfases agua-aceite.
- Para el caso de las NEs O/W, mismas que fueron estabilizadas con WPI, éstas presentaron menor estabilidad que su contraparte W/O, donde se observó la formación de una capa de cremado al cabo de las pruebas de desestabilización acelerada. Lo anterior puede deberse en principio a que los diámetros hidrodinámicos fueron mayores que los obtenidos en las NE W/O (≈ 200 nm) y que esta diferencia de tamaño puede conducir a procesos de desestabilización más fácilmente, pero que al evaluar su estabilidad durante el tiempo, el diámetro hidrodinámico se mantuvo constante durante los 25 días de almacenamiento a ambas condiciones de almacenamiento (4 y 25°C).
- La incorporación de los extractos hidro y lipofílico de SM en sistemas de NE mejoró la estabilidad química de estos bajo las condiciones de almacenamiento, debido a que la actividad antioxidante evaluada en las NE fue mayor respecto a los correspondientes extractos libres y cuya capacidad de secuestro de radicales libres no mostró diferencia significativa al inicio y final del almacenamiento. Cabe destacar que para el caso de las NEs O/W, la pérdida de la actividad antioxidante se vio favorecida durante el almacenamiento a 4°C.

REFERENCIAS

- Ajila, C. M., Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., Godbout, S., & Valero, J. R. (2011). Extraction and analysis of polyphenols: recent trends. *Critical reviews in biotechnology*, 31(3), 227-249.
- Akthar, M. S., Degaga, B., & Azam, T. (2014). Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: A review. *Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research*, 2(1), 1-7.
- Alizadeh, A. (2015). Essential oil composition, phenolic content, antioxidant, and antimicrobial activity of cultivated *Satureja rechingeri* Jamzad at different phenological stages. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 70(3-4), 51-58.
- Alupului, A., Calinescu, I., & Lavric, V. (2012). Microwave extraction of active principles from medicinal plants. *UPB Science Bulletin, Series B*, 74(2), 129-142.
- Amselem, S., & Friedman, D. (1998). Submicron emulsions as drug carriers for topical administration. *Submicron emulsions in drug targeting and delivery*, 9, 153-173.
- Arroyo, A. R., Chacón, B., & Maki, K. (2004). Screening and selection of plants by positive pharmacologic effect on jejunum muscular contractility. *Pharmaceutical biology*, 42(1), 24-29.
- Askun, T., Tumen, G., Satıl, F., & Karaarslan, D. (2012). Active constituents of some *Satureja L.* species and their biological activities. *African Journal of Microbiology Research*, 6(22), 4623-4633.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., ... & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426-436.
- Bahramikia, S., Yazdanparast, R., & Nosrati, N. (2008). A comparison of antioxidant capacities of ethanol extracts of *Satureja hortensis* and *Artemisia dracunculus* leaves. *Pharmacologyonline*, 2, 694-704.
- Bai, L., Huan, S., Gu, J., & Mc Clements, D. J. (2016). Fabrication of oil-in-water nanoemulsions by dual-channel microfluidization using natural emulsifiers: Saponins, phospholipids, proteins, and polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 61, 703-711.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.

- Bernardi, D. S., Pereira, T. A., Maciel, N. R., Bortoloto, J., Viera, G. S., Oliveira, G. C., & Rocha-Filho, P. A. (2011). Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: in vitro and in vivo assessments. *Journal of nanobiotechnology*, 9(1), 44.
- Bezić, N., Skočibušić, M., & Dunkić, V. (2005). Phytochemical composition and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. and *Satureja cuneifolia* Ten. essential oils. *Acta Botanica Croatica*, 64(2), 313-322.
- Bimakr, M., Rahman, R. A., Taip, F. S., Ganjloo, A., Salleh, L. M., Selamat, J., ... & Zaidul, I. S. M. (2011). Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. *Food and bioproducts processing*, 89(1), 67-72.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Camel, V. (2001). Recent extraction techniques for solid matrices—supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. *Analyst*, 126(7), 1182-1193.
- Ćavar, S., Maksimović, M., Šolić, M. E., Jerković-Mujkić, A., & Bešta, R. (2008). Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two *Satureja* essential oils. *Food Chemistry*, 111(3), 648-653.
- Cavero, S., Jaime, L., Martín-Álvarez, P. J., Senorans, F. J., Reglero, G., & Ibañez, E. (2005). In vitro antioxidant analysis of supercritical fluid extracts from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *European food research and technology*, 221(3-4), 478-486.
- Chan, S. M., Khoo, K. S., & Sit, N. W. (2015). Interactions between plant extracts and cell viability indicators during cytotoxicity testing: implications for ethnopharmacological studies. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 14(11), 1991-1998.
- Chiba, K., Kawakami, K., & Tohyama, K. (1998). Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicology in vitro*, 12(3), 251-258.
- Chkhikvishvili, I., Sanikidze, T., Gogia, N., Mchedlishvili, T., Enukidze, M., Machavariani, M., ... & Rodov, V. (2013). Rosmarinic acid-rich extracts of summer

- savory (*Satureja hortensis* L.) protect Jurkat T cells against oxidative stress. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013.
- Cuevas-Bernardino, J. C., Lobato-Calleros, C., Román-Guerrero, A., Alvarez-Ramirez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2016). Physicochemical characterisation of hawthorn pectins and their performing in stabilising oil-in-water emulsions. *Reactive and Functional Polymers*, 103, 63-71.
- De Azeredo, G. A., Stamford, T. L. M., Nunes, P. C., Neto, N. J. G., De Oliveira, M. E. G., & De Souza, E. L. (2011). Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. *Food Research International*, 44(5), 1541-1548.
- Dent, M., Dragović-Uzelac, V., Penić, M., Brnčić, M., Bosiljkov, T., Levaj, B., (2013). The effect of Extraction Solvents, Temperature and Time on the Composition and Mass Fraction of Polyphenols in Dalmatian Wild Sage (*Salvia officinalis* L.) Extracts. *Food Technology and Biotechnology*. 51(1) 84
- Dhanani, T., Shah, S., Gajbhiye, N. A., & Kumar, S. (2013). Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Withania somnifera*. *Arabian Journal of Chemistry*.
- Donsì F., Senatore B., Huang Q. & Ferrari G. (2010). Development of Novel Pea Protein-Based Nanoemulsions for Delivery of Nutraceuticals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 10653-10660.
- Dragovic-Uzelac, V., Garofulic, I. E., Jukic, M., Penic, M., & Dent, M. (2012). The influence of microwave-assisted extraction on the isolation of sage (*Salvia officinalis* L.) polyphenols. *Food Technology and Biotechnology*, 50(3), 377.
- El-Aasser, M. S., & Sudol, E. D. (2004). Miniemulsions: overview of research and applications. *JCT research*, 1(1), 21-32.
- Elfiyani, R., Amalia, A., & Septian, Y. P. (2017). Effect of Using the Combination of Tween 80 and Ethanol on the Forming and Physical Stability of Microemulsion of Eucalyptus Oil as Antibacterial. *Journal of Young Pharmacists*, 9(1), s1.
- García-Márquez, E., Román-Guerrero, A., Pérez-Alonso, C., Cruz-Sosa, F., Jiménez-Alvarado, R., & Vernon-Carter, E. J. (2012). Effect of solvent-temperature extraction conditions on the initial antioxidant activity and total phenolic content of muiltle extracts and their decay upon storage at different pH. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11(1).

- Garofulić, I. E., Dragović-Uzelac, V., Jambrak, A. R., & Jukić, M. (2013). The effect of microwave assisted extraction on the isolation of anthocyanins and phenolic acids from sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. Marasca). *Journal of Food Engineering*, 117(4), 437-442.
- Genena, A. K., Hense, H., Smânia Junior, A., & Souza, S. M. D. (2008). Rosemary (*Rosmarinus officinalis*): a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. *Food Science and Technology (Campinas)*, 28(2), 463-469.
- Giada, M. D. L. R. (2013). Food phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidant power. In *Oxidative stress and chronic degenerative diseases-A role for antioxidants*. InTech.
- Grosso, C., Figueiredo, A. C., Burillo, J., Mainar, A. M., Urieta, J. S., Barroso, J. G., ... & Palavra, A. M. (2009). Enrichment of the thymoquinone content in volatile oil from *Satureja montana* using supercritical fluid extraction. *Journal of separation science*, 32(2), 328-334.
- Gutierrez, R. M. P. (2013). Antihepatotoxic, nephroprotective, and antioxidant activities of phenolic compounds from *Satureja macrostema* leaves against carbon tetrachloride-induced hepatic damage in mice. *Medicinal Chemistry Research*, 1-10.
- Gutierrez, R. M. P., & Navarro, Y. T. G. (2010). Antioxidant and hepatoprotective effects of the methanol extract of the leaves of *Satureja macrostema*. *Pharmacognosy magazine*, 6(22), 125.
- Gutiérrez, R. M. P., Diaz, S. L., Reyes, I. C., & Gonzalez, A. M. N. (2010). Anti-glycation effect of spices and chilies uses in traditional mexican cuisine. *Journal of Natural Products*, 3, 95-102.
- Hajhashemi, V., Sadraei, H., Ghannadi, A. R., & Mohseni, M. (2000). Antispasmodic and anti-diarrhoeal effect of *Satureja hortensis* L. essential oil. *Journal of ethnopharmacology*, 71(1), 187-192.
- Hajhashemi, V., Zolfaghari, B., & Yousefi, A. (2012). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Satureja hortensis* seed essential oil, hydroalcoholic and polyphenolic extracts in animal models. *Medical Principles and Practice*, 21(2), 178-182.
- Hernández-Jaimes, C., Fouconnier, B., Pérez-Alonso, C., Munguía-Guillén, J.L., Vernon-Carter, E.J. (2013). Antioxidant activity degradation, formulation

- optimization, characterization and stability of *Equisetum arvense* extract nanoemulsion. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 1: 64-71.
- Hossain, M. B., Rai, D. K., Brunton, N. P., Martin-Diana, A. B., & Barry-Ryan, C. (2010). Characterization of phenolic composition in Lamiaceae spices by LC-ESI-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(19), 10576-10581.
- Huie, C. W. (2002). A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 373(1), 23-30.
- Jafari, F., Ghavidel, F., & Zarshenas, M. M. (2016). A critical overview on the pharmacological and clinical aspects of popular *Satureja* species. *Journal of acupuncture and meridian studies*, 9(3), 118-127.
- Jaiswal, M., Dudhe, R., & Sharma, P. K. (2015). Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. *3 Biotech*, 5(2), 123-127.
- Jiao, Y., & Zuo, Y. (2009). Ultrasonic extraction and HPLC determination of anthraquinones, aloe-emodine, emodine, rheine, chrysophanol and physcione, in roots of *Polygoni multiflori*. *Phytochemical Analysis*, 20(4), 272-278.
- Khoddami, A., Wilkes, M. A., & Roberts, T. H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18(2), 2328-2375.
- Kivilompolo, M., & Hyötyläinen, T. (2009). On-line coupled dynamic sonication-assisted extraction–liquid chromatography for the determination of phenolic acids in Lamiaceae herbs. *Journal of Chromatography A*, 1216(6), 892-896.
- Komaiko, J. S., & McClements, D. J. (2016). Formation of Food-Grade Nanoemulsions Using Low-Energy Preparation Methods: A Review of Available Methods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(2), 331-352.
- Kumar, S.L.H. & Singh, V. (2012). Nanoemulsification – A novel targeted drug delivery tool. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 2, 40-45.
- Law, J. W. F., Ab Mutalib, N. S., Chan, K. G., & Lee, L. H. (2015). Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Frontiers in microbiology*, 5, 770.
- Lee, K. L. (2011). Applications and Use of Microemulsions. *arXiv preprint arXiv:1108.2794*.
- Li, P. H., & Lu, W. C. (2016). Effects of storage conditions on the physical stability of d-limonene nanoemulsion. *Food Hydrocolloids*, 53, 218-224.

- Manaf, M. A., Mustapa, A. N., & Mustapa, K. (2013). Supercritical fluid extraction of Citronella oil from *Cymbopogon nardus* and its optimization. In *Business Engineering and Industrial Applications Colloquium (BEIAC), 2013 IEEE* (pp. 73-78). IEEE.
- Mandal, V., Mohan, Y., & Hemalatha, S. (2007). Microwave assisted extraction—an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy reviews*, 1(1), 7-18.
- Martysiak-Żurowska, D., & Wenta, W. (2012). A comparison of ABTS and DPPH methods for assessing the total antioxidant capacity of human milk. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 11(1), 83-89.
- Mc Clements, D. J. (2007). Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(7), 611-649.
- Mc Clements, D. J., & Gumus, C. E. (2016). Natural emulsifiers—Biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance. *Advances in colloid and interface science*, 234, 3-26.
- Meyers, K. J., Watkins, C. B., Pritts, M. P., & Liu, R. H. (2003). Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(23), 6887-6892.
- Miller, H. E., (1971). A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 48(2), 91.
- Moghimi, R., Ghaderi, L., Rafati, H., Aliahmadi, A., & McClements, D. J. (2016). Superior antibacterial activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* essential oil against *E. coli*. *Food chemistry*, 194, 410-415.
- Mokrani, A., & Madani, K. (2016). Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit. *Separation and Purification Technology*, 162, 68-76.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26, 211-219.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.
- Mokrani, A., & Madani, K. (2016). Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity

- of peach (*Prunus persica* L.) fruit. *Separation and Purification Technology*, 162, 68-76.
- Muanda, F. N., Dicko, A., & Soulimani, R. (2010). Chemical composition and biological activities of *Ficus capensis* leaves extracts. *Journal of Natural Products*, 3(1), 147-160.
- Munin, A., & Edwards-Lévy, F. (2011). Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. *Pharmaceutics*, 3(4), 793-829.
- Nakajima, H. (1997). Microemulsions in cosmetics. *Surfactant science series*, 66, 175-197.
- Nasshorudin, D., Ahmad, M. S., & Mamat, A. S. (2016). Novel Closed System Extraction of Essential Oil: A Green Approach. *American Journal of Biochemistry*, 6(6), 145-148.
- Niemeyer, H. M. (2010). Composition of essential oils from *Satureja darwinii* (Benth.) Briq. and *S. multiflora* (R. et P.) Briq. (Lamiaceae). Relationship between chemotype and oil yield in *Satureja* spp. *Journal of Essential Oil Research*, 22(6), 477-482.
- Novak, I., Janeiro, P., Seruga, M., & Oliveira-Brett, A. M. (2008). Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of Portuguese red grape skins determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Analytica chimica acta*, 630(2), 107-115.
- Oke, F., Aslim, B., Ozturk, S., & Altundag, S. (2009). Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. *Food Chemistry*, 112(4), 874-879.
- Ortega-Ortega, T., Vázquez-García, V. (2014). *Satureja macrostema*: situación ambiental, conocimiento local y roles de género. *Madera Bosques* 20, 71-86.
- Patel, R.P. & Joshi, J.R. (2012). An overview on nanoemulsion: A novel approach. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3: 4640-4650.
- Petzold, G., Goltzsche, C., Mende, M., Schwarz, S., & Jaeger, W. (2009). Monitoring the stability of nanosized silica dispersions in presence of polycations by a novel centrifugal sedimentation method. *Journal of applied polymer science*, 114(2), 696-704.
- Piorkowski, D. T., & McClements, D. J. (2014). Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications. *Food Hydrocolloids*, 42, 5-41.

- Rashed, M. M., Tong, Q., Abdelhai, M. H., Gasmalla, M. A., Ndayishimiye, J. B., Chen, L., & Ren, F. (2016). Effect of ultrasonic treatment on total phenolic extraction from *Lavandula pubescens* and its application in palm olein oil industry. *Ultrasonics sonochemistry*, 29, 39-47.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Repetto, G., Del Peso, A., & Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature protocols*, 3(7), 1125.
- Rostagno, M. A., D'Arrigo, M., & Martínez, J. A. (2010). Combinatory and hyphenated sample preparation for the determination of bioactive compounds in foods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29(6), 553-561.
- Roy, B. C., Sasaki, M., & Goto, M. (2006). Effect of temperature and pressure on the extraction yield of oil from sunflower seed with supercritical carbon dioxide. *Journal of Applied Sciences*, 6(1), 71-75.
- Saberi, A. H., Fang, Y., & McClements, D. J. (2013). Effect of glycerol on formation, stability, and properties of vitamin-E enriched nanoemulsions produced using spontaneous emulsification. *Journal of colloid and interface science*, 411, 105-113.
- Seidi Damyeh, M., Niakousari, M., Saharkhiz, M. J., & Golmakani, M. T. (2016). Evaluating the Effect of Essential Oil Extraction Method from *Satureja macrosiphonia* on Its Biological Activities: Ohmic-and Microwave-Assisted Hydrodistillation. *Journal of Food Processing and Preservation*, 40(4), 697-706.
- Shahavi, M. H., Hosseini, M., Jahanshahi, M., Meyer, R. L., & Darzi, G. N. (2015). Evaluation of critical parameters for preparation of stable clove oil nanoemulsion. *Arabian Journal of Chemistry*.
- Sharmila, G., Nikitha, V. S., Ilaiyarasi, S., Dhivya, K., Rajasekar, V., Kumar, N. M., ... & Muthukumar, C. (2016). Ultrasound assisted extraction of total phenolics from *Cassia auriculata* leaves and evaluation of its antioxidant activities. *Industrial Crops and Products*, 84, 13-21.
- Silva, C. F., Moura, F. C., Mendes, M. F., & Pessoa, F. L. P. (2011). Extraction of citronella (*Cymbopogon nardus*) essential oil using supercritical CO₂: Experimental data and mathematical modeling. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28(2), 343-350.

- Soni, M., Patidar, K., Jain, D., & Jain, S. (2010). Ultrasound assisted extraction (UAE): a novel extraction technique for extraction of nutraceuticals from plants. *Journal of Pharmacy Research*, 3(3), 636-638.
- Sulaiman, I. S. C., Basri, M., Masoumi, H. R. F., Ashari, S. E., & Ismail, M. (2016). Design and development of a nanoemulsion system containing extract of *Clinacanthus nutans* (L.) leaves for transdermal delivery system by D-optimal mixture design and evaluation of its physicochemical properties. *RSC Advances*, 6(71), 67378-67388.
- Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., & Solans, C. (2004). Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in colloid and interface science*, 108, 303-318.
- Tepe, B., & Cilkiz, M. (2016). A pharmacological and phytochemical overview on *Satureja*. *Pharmaceutical biology*, 54(3), 375-412.
- Turek, C., & Stintzing, F. C. (2013). Stability of essential oils: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(1), 40-53.
- Vallverdú-Queralt, A., Rigueiro, J., Alvarenga, J. F. R., Martínez-Huelamo, M., Leal, L. N., & Lamuela-Raventós, R. M. (2015). Characterization of the phenolic and antioxidant profiles of selected culinary herbs and spices: caraway, turmeric, dill, marjoram and nutmeg. *Food Science and Technology (Campinas)*, 35(1), 189-195.
- Varalakshmi, K. N., Sangeetha, C. G., Samee, U. S., Irum, G., Lakshmi, H., & Prachi, S. P. (2011). In vitro safety assessment of the effect of five medicinal plants on human peripheral lymphocytes. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 10(1), 33-40.
- Vian, M. A., Maingonnat, J. F., & Chemat, F. (2009). Clean recovery of antioxidant flavonoids from onions: Optimising solvent free microwave extraction method. *Journal of Chromatography A*, 1216(45), 7700-7707.
- Villa-Ruano, N., Pacheco-Hernández, Y., Cruz-Durán, R., & Lozoya-Gloria, E. (2015). Volatiles and seasonal variation of the essential oil composition from the leaves of *Clinopodium macrostemum* var. *laevigatum* and its biological activities. *Industrial Crops and Products*, 77, 741-747.
- Villa-Ruano, N., Zurita-Vásquez, G. G., Pacheco-Hernández, Y., Betancourt-Jiménez, M. G., Cruz-Durán, R., & Duque-Bautista, H. (2013). Anti-lipase and antioxidant properties of 30 medicinal plants used in Oaxaca, México. *Biological research*, 46(2), 153-160.

- Vladimir-Knežević, S., Blažeković, B., Kindl, M., Vladić, J., Lower-Nedza, A.D., Brantner, A.H. (2014). Acetylcholinesterase inhibitory, antioxidant and phytochemical properties of selected medicinal plants of the Lamiaceae family. *Molecules* 19: 767-782.
- Wang, L., & Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(6), 300-312.
- Wu, T. T., Shiau, S. Y., & Chang, R. C. (2013). Effects of drying temperature and extraction solvent on the antioxidant, color and sensory properties of *Angelica sinensis* leaves. *Journal of Food Processing and Preservation*, 37(4), 371-379.
- Yuan C, Gao J, Guo J, Bai L, Marshall C, Cai Z, Wang L., Xiao M (2014). Dimethyl sulfoxide damages mitochondrial integrity and membrane potential in cultured astrocytes. *PloS one*, 9(9): e107447.
- Zeeb, B., Herz, E., McClements, D. J., & Weiss, J. (2014). Impact of alcohols on the formation and stability of protein-stabilized nanoemulsions. *Journal of colloid and interface science*, 433, 196-203.
- Zheng, L. L., Wen, G., Yuan, M. Y., & Gao, F. (2016). Ultrasound-assisted extraction of total flavonoids from corn silk and their antioxidant activity. *Journal of Chemistry*, 2016, 1-5.

ANEXO

Publicación

Extraction of phenolic compounds from *Satureja macrostema* using microwave-ultrasound assisted and reflux methods and evaluation of their antioxidant activity and cytotoxicity

Nancy Alonso-Carrillo, Ma. de los Ángeles Aguilar-Santamaría, E. Jaime Vernon-Carter, Rubén Jiménez-Alvarado, Francisco Cruz-Sosa, Angélica Román-Guerrero.

Industrial Crops & Products 103 (2017) 213–221

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/316146789>

Extraction of phenolic compounds from *Satureja macrostema* using microwave-ultrasound assisted and reflux...

Article in *Industrial Crops and Products* · September 2017

DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.04.002

CITATIONS

0

READS

33

6 authors, including:



[E. Jaime Vernon-Carter](#)

Metropolitan Autonomous University

210 PUBLICATIONS 3,503 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



[Ruben Jimenez](#)

Autonomous University of Hidalgo

11 PUBLICATIONS 103 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



[Francisco Cruz-Sosa](#)

Metropolitan Autonomous University

83 PUBLICATIONS 622 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



[Angelica Roman-Guerrero](#)

Metropolitan Autonomous University

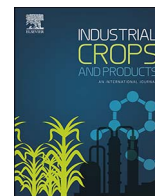
28 PUBLICATIONS 241 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Comparison of the anti-inflammatory effect and toxicity of extracts obtained from wild medicinal plants and their cell cultures [View project](#)



Extraction of phenolic compounds from *Satureja macrostema* using microwave-ultrasound assisted and reflux methods and evaluation of their antioxidant activity and cytotoxicity



Nancy Alonso-Carrillo^a, Ma. de los Ángeles Aguilar-Santamaría^b, E. Jaime Vernon-Carter^c,
Rubén Jiménez-Alvarado^d, Francisco Cruz-Sosa^a, Angélica Román-Guerrero^{a,*}

^a Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco No. 186 Col. Vicentina, CP 09340 México, D.F., Mexico

^b Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico

^c Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico

^d Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Rancho Universitario, Av. Universidad Km. 1, Ex-Hda, de Aquezalpa A.P. 32, C.P. 43600, Tulancingo, Hgo, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Satureja macrostema
Phenolic compounds
Antioxidant activity
Microwave-ultrasound assisted method
Lymphocyte cell viability

ABSTRACT

Satureja macrostema (SM) is commonly used as a spice and medicinal plant in Mexico. Ethanolic extracts at different concentrations (E0, E50, E75, E100) were obtained by reflux (RE) and microwave-ultrasound assisted (MUAE) techniques at three extraction times (30, 60, and 120 min). The total phenolics content (TPC), total flavonoids content (TFC), and total soluble solids (TSS), as well as the antioxidant activity by DPPH and ABTS assays were determined. Results showed that active compound concentrations were dependent on the extraction conditions. The solvent and time of extraction affected TPC, TFC, and TSS values rather than the extraction technique. For the antioxidant activity, MUAE extracts displayed lower median inhibition concentration (IC₅₀) values than RE, resulting in a higher radical scavenging ability, which can be attributed to the lower temperatures used in MUAE and the higher stability of the extracted compounds. A Pearson correlation was aimed to establish the significant effects between the variables. It was found that ABTS was highly correlated to TPC for both extraction techniques. The extracts E50–120 min for RE and E100–30 min for MUAE, with significant higher TPC (114.08 ± 0.25 and 133.91 ± 0.39 mg_{GAE}/g_{TSS} respectively) and lower IC₅₀ (12.31 ± 0.02 and 10.85 ± 0.13 μg_{TSS}/mL respectively) were chosen for HPLC and cytotoxicity assays. Rosmarinic acid was found as the main component in both SM extracts. Cytotoxicity was performed exposing lymphocytes to both extracts at two concentrations (0.1 and 1.0 mg_{TSS}/mL), using Neutral Red (NR) and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assays. Cell viability data did not show statistically significant difference compared with untreated cells ($p < 0.05$), therefore, a cytotoxic effect of SM extracts was not found even at 1.0 mg_{TSS}/mL.

1. Introduction

Satureja macrostema (SM) is an aromatic herb belonging to the Lamiaceae family. It is known in Mexico as poleo, nurite, among others. The aerial parts of the plant have been used in folk Mexican medicine as infusion against gastrointestinal diseases and in cuisine (Ortega-Ortega and Vázquez-García, 2014; Perez Gutierrez and Gallardo Navarro, 2010; Cortés et al., 2004). For these reasons it has been considered as a non-toxic plant. SM contains polyphenolic compounds like flavonoids, which have been related with antioxidant and hepatoprotective effects (Perez Gutierrez and Gallardo Navarro, 2010).

Polyphenols range from polar to non-polar compounds, displaying a wide variety of biological activities *in vitro* and *in vivo*. They have demonstrated to be useful to prevent diseases related with an excessive oxygen radical formation. Therefore the bioactivity of polyphenolic compounds is strongly dependent on the extraction conditions as the type of solvent, the temperature and the extraction process itself. For these reasons it is very important to select the appropriate combination of these variables in order to improve the extraction and functionality of polyphenolic compounds (Sharmila et al., 2016; Dragović-Uzelac et al., 2012; García-Márquez et al., 2012).

Conventionally, polyphenolic compounds are extracted overnight

* Corresponding author.

E-mail addresses: arogue@xanum.uam.mx, aromangro@gmail.com (A. Román-Guerrero).

under stirring or rotation, employing large volumes of solvent under vigorous agitation and/or high temperature conditions, like the extraction performed at the boiling-point of the solvent known as reflux extraction (RE). Since RE requires long extraction times at high temperatures and large volumes of frequently toxic solvents, the degradation of the bioactive compounds and the suitability for human consumption can not be underestimated (Odabas and Koca, 2016; Sharmila et al., 2016; Vongsak et al., 2013).

To overcome these drawbacks, alternative extraction methods have been arisen, such as microwave and ultrasound assisted technologies, which allow to accelerate the extraction processes and to improve the leaching of polyphenolic compounds from plant materials. Microwave assisted extraction enhances the extraction efficiency when compared to conventional extraction. As microwaves interact with the polar molecules in the extraction media, heat is generated and the internal pressure of the solid material is increased. Using microwave-assisted extraction of polyphenolic compounds from plant materials decreases the extraction time significantly (Beejmohun et al., 2007; Proestos and Komaitis, 2008; Ince et al., 2014). On the other hand, cavitation phenomena and mechanical mixing effect are the main mechanisms in ultrasound-assisted extraction. Ultrasound increases the extraction efficiency and reduces the extraction time since the mass transfer seems to be intensified, due to the cellular disruption, the high penetration of solvent and the promotion of capillary effects. Moreover, thermal decomposition of heat sensitive compounds is avoided in ultrasonic technique, since it is a non-thermal process (Ma et al., 2008). Therefore, a combination of ultrasound and microwave techniques may show several advantages (Chen et al., 2010; Taghvaei et al., 2014; Rahmani et al., 2015).

It is important to consider that even though the maximum extraction yield is always procured to meet the requirements for functional activities, especially when they are sought to be applied in food or pharmaceutical industries, the health and environmental risks must be considered when an extraction solvent is chosen (Handa et al., 2016; Do et al., 2014). According to Rafiee et al. (2011), application of water combined with other organic solvents makes it a moderately polar medium ensuring the optimal conditions for extraction of polyphenols, leading to an increase in swelling of plant materials and the contact surface area between the plant matrix and the solvent improving the extraction yield. In this context, green extraction solvents like water and ethanol become more suitable than others absolute solvents like methanol, acetone or acetonitrile.

Therefore, the present work is an attempt to focus on the effectiveness of the microwave-ultrasound cooperative technology in the extraction of total phenolic compounds from the plant sources like *S. macrostema*, through the comparison with the reflux method as a conventional technique. As well as studying some of the biological properties of the SM extracts, to better contribute to the promotion of the use of natural compounds as an important and safer alternative of antioxidant compounds.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and reagents

Fresh leaves of *S. macrostema* were collected in its vegetative stage before flowering during the month of October in 2013 from San Pedro el Alto (16° 47' 51.71" N; 97° 2' 24.8" W) Oaxaca, Mexico. The leaves were shade dried during one week and then the dried material was finely milled, sieved using a Mesh 16 (1.19 mm) and stored at room temperature in dark plastic bags until used.

Analytical reagents and standards used were: Folin-Ciocalteu reagent, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS), potassium persulfate (K₂S₂O₈), dimethylsulfoxide (DMSO), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), 3-amino-7-dimethylamino-2-

methyl-phenazine hydrochloride (neutral red (NR)), phenolic acids and flavonoids standards were purchased from Sigma-Aldrich (Toluca, State of Mexico, Mexico). McCoy's 5a modified medium, phytohemagglutinine, Dulbecco's phosphate buffer solution (PBS), were purchased from Microlab S.A. de C.V. (Mexico city, Mexico). Ammonium chloride (NH₄Cl) and potassium bicarbonate (KHCO₃) were purchased from Fermont. Sodium carbonate (Na₂CO₃), sodium nitrite (NaNO₂), aluminium chloride (AlCl₃), sodium hydroxide (NaOH), potassium chloride (KCl), and tetrasodium EDTA, were purchased from J.T. Baker S.A. de C.V. (Xalostoc, Mexico). Solvents used were: methanol (ME) and absolute ethanol (E) analytical grade purchased from Teesiquim S.A. de C.V. (Mexico city, Mexico). Glacial acetic acid (AcOH), acetonitrile (HPLC grade), isopropyl alcohol (IPA), and formic acid were purchased from J.T. Baker S.A. de C.V. (Xalostoc, Mexico). Penicillin-streptomycin solution (5000 U/ug/mL in solution of NaCl at 0.85%) was purchased from *In Vitro*, S.A. de C.V. (Mexico city, Mexico). Deionized and distilled water were used throughout the experiments.

2.2. Extraction procedure

There were used three grams of sample in 90 mL of different extraction media: Absolute ethanol (E100), ethanol 75% (E75), ethanol 50% (E50), or water (E0). The extracts obtained by either RE or MUAE techniques were filtered through a Whatman 2 filter paper followed by a 0.45 μm microporous membrane. All the filtrates were collected and stored at 4 °C until used. The resultant extracts were coded as the combination of the type of solvent used and the extraction time for each extraction technique.

2.2.1. Reflux extraction (RE)

For RE, the vegetal material and the appropriate extraction solvent were added into a round-bottom flask and heated until the solvents (E100, E70, E50, E0) reached their boiling point and heating under reflux (Fig. 1a) for 30, 60, or 120 min.

2.2.2. Microwave-ultrasound assisted extraction (MUAE)

For MUAE, a CW-2000A Ultrasonic-Microwave Cooperative Extractor/Reactor operating with a microwave maximal power of 800 W at a frequency of 2450 MHz, and an ultrasonic transducer with a fixed power of 50 W at a frequency of 40 kHz was used to extract the polyphenolic compounds from *S. macrostema* (Fig. 1b). The proper amounts of vegetal material and solvent were transferred into a flask. It was placed into the chamber of the apparatus and assembled with the condenser tubes. The extraction variables were the time (30, 60, and 120 min) and the solvent (E100, E70, E50, E0) used for extraction. The microwave power and temperature were set at 500W and 40 °C in agreement to previous experiments (data not shown). When the extraction was completed, the flask was removed from apparatus and the extract was filtrated and stored as mentioned in section 2.2.

2.3. Characterization of extracts

2.3.1. Extraction yield

An aliquot of 5 mL of fresh extract was dried in an oven at 50 °C during 12 h until reach constant weight and the amount of total soluble solids in the extract (W_{TSS}) was determined, and compared to initial amount of whole dried material (W_{DM}) used for the extraction. This procedure was done for all the treatments. The yield was calculated using Eq. (1) and reported as grams of total soluble solids (TSS) per 100 g of extract.

$$Yield (g_{TSS}/100g_{extract}) = \frac{W_{TSS}}{W_{extract}} \quad (1)$$

2.3.2. Determination of total phenolics content (TPC)

TPC was determined with Folin-Ciocalteu reagent according to the

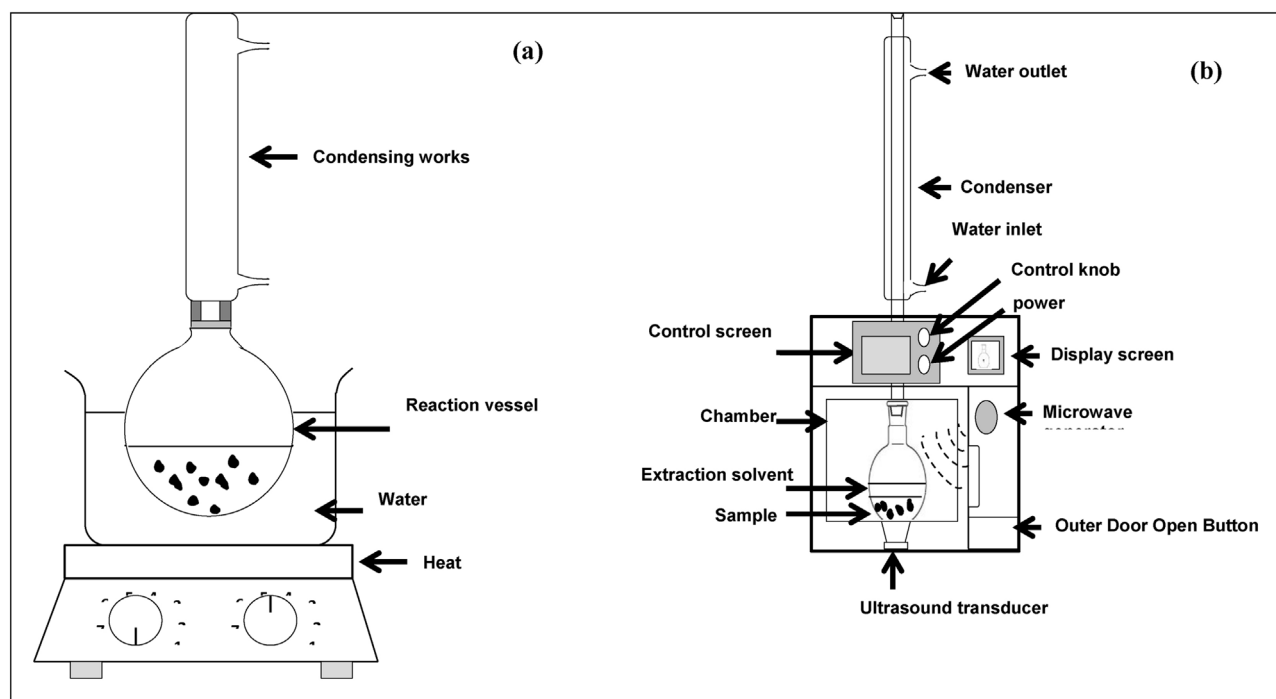


Fig. 1. Schematic diagram of RE (a) and MUAE (b) apparatus used.

method of Singleton and Rossi (1965) using gallic acid as standard. Briefly, 1.0 mL of fresh extract was mixed with 0.25 mL of Folin-Ciocalteu reagent, 0.25 mL of Na_2CO_3 (20% w/v) and 2.5 mL of distilled water. This mixture was vortexed for 2 min and stand for 60 min at room temperature. The absorbance at 765 nm was measured using a Spectronic GENESYS 2 UV–vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA). TPC was calculated based on the standard curve of gallic acid, and results were expressed as milligrams of gallic acid equivalent per gram of extract ($\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{extract}}$).

2.3.3. Determination of total flavonoid content (TFC)

TFC was determined according to Zhishen et al. (1999). Briefly, 1 mL of sample (extract or catechin standard) was added into 10 mL volumetric flask and distilled water was added to make a volume of 5 mL. At zero time, 0.3 mL of NaNO_2 (5% w/v) were added to the flask and mixed. After 5 min, 0.6 mL of AlCl_3 (10% w/v) were added and were letting stand for 6 min. Then, 2 mL of 1 M NaOH were also added to the mixture, followed by the addition of 2.1 mL distilled water. Finally, the absorbance was read at 510 nm against a blank sample (water). TFC was expressed as milligrams of catechin equivalents (mg_{CatE}) per gram of extract.

2.3.4. DPPH radical scavenging activity

The radical scavenging capacity of the fresh extract on DPPH was determined according to Shimada et al. (1992). An aliquot of 1 mL of fresh extract at different concentrations was mixed with 1 mL of 0.1 mM DPPH in ME. The mixture was shaken vigorously and left to stand for 30 min at 25 °C. The absorbance of the resulting solution was determined at 517 nm against a blank (only ME). The DPPH radical scavenging activity was calculated as follows (Eq. (2)):

$$\text{DPPH}_{\text{Scavenging activity}} (\%) = \left[1 - \frac{A_1}{A_0} \right] \times 100 \quad (2)$$

where A_0 is the absorbance of the blank sample (without antioxidant) and A_1 is the absorbance of the sample containing the extract. Median inhibition concentration (IC_{50}) values were calculated and denote the concentration of antioxidant required to inhibit 50% of radical ($\mu\text{g}_{\text{TSS}}/\text{mL}_{\text{extract}}$).

2.3.5. ABTS radical scavenging activity

The ABTS radical decolorization assay was carried out using the method reported by Re et al. (1999). The ABTS Stock solution was prepared by adding 0.0768 g of ABTS salt and 13.2 mg of $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ in 20 mL of deionized water. Stock solution was stored in the dark for 16 h at room temperature before use. The ABTS^+ radical solution was diluted with ET until reach an absorbance value of 0.70 ± 0.02 at 734 nm. After, 1000 μL of diluted ABTS^+ radical solution was mixed with 10 μL of various concentrations of fresh extracts. The mixture was allowed to react for 6 min, and the absorbance at 734 nm was measured. The ABTS^+ radical scavenging activity was calculated as follows (Eq. (3)):

$$\text{ABTS}_{\text{Scavenging activity}} (\%) = \left[\frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \right] \times 100\% \quad (3)$$

where A_0 is the absorbance of the blank sample (without antioxidant) and A_1 is the absorbance of the sample containing the extract. The results were expressed as IC_{50} ($\mu\text{g}_{\text{TSS}}/\text{mL}_{\text{extract}}$).

2.4. Identification of major components

The *S. macrostema* extracts chosen for the HPLC analysis were for RE the E50–120 min and E100–30 min for MUAE, respectively. The selection of these extracts was based on the recoveries of TPC values and lower IC_{50} for ABTS, in agreement to Pearson correlation analyses. Briefly, the composition of the extracts was determined according to Vladimir-Knežević et al. (2014). HPLC analysis was conducted on an Agilent 1100 Series instrument (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with Agilent auto-sampler, quaternary pump, column thermostat, and photodiode array detector. The separation was achieved using a Kromasil C18 5 μ 100A (4.6 \times 250 mm) column. The mobile phase consisted of acidified acetonitrile (5% formic acid in acetonitrile; solvent A) and acidified water (5% formic acid in water; solvent B). The gradient employed was as follows: 0 min, 15% A; 25 min, 35% A; 27 min, 70% A; 32 min, 70% A; 33 min, 100% A; 38 min, 100% A. The flow rate was maintained constant at 0.9 mL/min and the injection volume was 20 μL . All the chromatographic experiments were performed at 20 °C. The chromatograms were recorded at a

Table 1

Comparison of the extraction yield, total phenolics content and total flavonoids content corresponding to each extraction technique.

Solvent	Time (min)	Yield (g _{TSS} /100 g _{extract})	TPC (mgGAE/g _{extract})	TFC (mgCatE/g _{extract})
HEAT REFLUX EXTRACTS (RE)				
E0	30	0.96 ± 0.00 ^d	112.19 ± 1.22 ^e	62.31 ± 2.04 ^{d,e}
E0	60	1.02 ± 0.00 ^{c,d}	102.74 ± 2.44 ^f	68.03 ± 0.54 ^d
E0	120	1.09 ± 0.01 ^c	96.91 ± 0.48 ^g	59.76 ± 0.76 ^{d,e}
E50	30	1.18 ± 0.00 ^b	126.86 ± 0.13 ^c	67.54 ± 1.12 ^d
E50	60	1.07 ± 0.01 ^c	141.69 ± 1.36 ^a	66.26 ± 0.23 ^d
E50	120	1.24 ± 0.02 ^a	114.08 ± 0.25 ^c	82.20 ± 3.01 ^c
E75	30	1.23 ± 0.01 ^a	120.52 ± 0.57 ^d	66.87 ± 2.18 ^d
E75	60	1.22 ± 0.03 ^a	131.84 ± 1.74 ^b	52.61 ± 1.39 ^e
E75	120	1.28 ± 0.04 ^a	120.98 ± 1.21 ^d	71.66 ± 1.28 ^{c,d}
E100	30	0.47 ± 0.02 ^f	127.11 ± 1.88 ^c	112.22 ± 12.17 ^a
E100	60	0.51 ± 0.00 ^f	141.61 ± 0.84 ^a	100.51 ± 0.69 ^{a,b}
E100	120	0.58 ± 0.0 ^e	114.63 ± 2.37 ^e	96.54 ± 5.49 ^b
MICROWAVE-ULTRASOUND ASSISTED EXTRACTS (MUAE)				
E0	30	0.87 ± 0.00 ^D	97.28 ± 0.16 ^I	62.49 ± 1.20 ^G
E0	60	0.85 ± 0.01 ^D	91.01 ± 1.4 ^J	36.01 ± 1.3 ^H
E0	120	0.89 ± 0.03 ^D	104.48 ± 0.34 ^H	30.65 ± 0.67 ^H
E50	30	1.27 ± 0.05 ^A	119.34 ± 0.40 ^G	88.33 ± 0.4 ^{C,D,E}
E50	60	1.07 ± 0.0 ^C	142.21 ± 1.34 ^E	78.94 ± 1.19 ^{E,F}
E50	120	1.21 ± 0.01 ^A	145.30 ± 0.52 ^D	68.20 ± 0.25 ^{F,G}
E75	30	1.08 ± 0.0 ^C	166.09 ± 0.12 ^A	99.16 ± 2.18 ^{B,C}
E75	60	1.15 ± 0.02 ^B	139.72 ± 1.58 ^E	93.64 ± 2.45 ^D
E75	120	1.07 ± 0.0 ^C	132.59 ± 1.41 ^F	82.67 ± 1.16 ^{D,E}
E100	30	0.33 ± 0.01 ^E	133.91 ± 0.39 ^F	109.72 ± 10.05 ^{A,B}
E100	60	0.33 ± 0.00 ^E	151.75 ± 0.2 ^C	111.01 ± 9.44 ^{A,B}
E100	120	0.34 ± 0.00 ^E	161.69 ± 0.13 ^B	123.88 ± 8.62 ^A

Values are mean ± SD of triplicate experiments.

Different capital or lowercase letters in the same column means statistically significant differences between treatments ($p < 0.05$).

wavelength of 330 nm. The major component was identified based on chromatographic retention times and UV spectra, and quantified by comparing integrated peak areas to calibration curves prepared with the corresponding standard. The results were expressed in $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{TSS}}$. All the HPLC analyses were performed in triplicate.

2.5. In vitro cytotoxicity

The cytotoxic effect of extracts of *S. macrostema* in human peripheral blood lymphocytes was evaluated by MTT and neutral red assays.

For the cell cultures, peripheral blood samples were obtained from six healthy adult donors (three females and three males), 27 years old on average. Cultures were prepared placing 0.5 mL of whole blood into plastic tubes containing 2.5 mL of McCoy's 5a modified medium, added with 4% phytohemagglutinin and 0.4% antibiotic solution. The cultures were incubated at 37 °C. After the first 24 h of incubation, from each sample of donor, 6 groups of 3 cultures each, were formed and prepared in triplicate (i.e. three tubes for each condition): (I) Control, (II) Control with DMSO (0.5% final concentration), 2 experimental groups for MUAE (III, IV) and 2 experimental groups for RE (V, VI). For this evaluation, all the extracts (MUAE and RE) were lyophilized and re-suspended in DMSO (0.5% final concentration) in order to obtain 0.1 and 1 mg_{TSS}/mL respectively, and sterilized by filtering twice through 0.45 μm membranes. Both concentrations were tested on groups III to VI. All the samples were incubated at 37 °C for 48 h. After exposition, each group (I–VI) was subdivided into two test tubes. The former was used for NR and the latter for MTT assays. 5 mL of PBS were added to each test tube and centrifuged at 1500 rpm for 10 min. Lymphocytes were separated from the whole culture by centrifugation and taking a 75 μL aliquot from the buffy coat. This method was based on that described by Varalakshmi et al. (2011) with some modifications. The fraction of lymphocytes were collected and introduced in new tubes and re-suspended in 5 mL of PBS, incubated in the darkness for 15 min, and centrifuged at 2000 rpm for 10 min. The supernatant was removed and

mixed with 5 mL of lysis buffer (NH_4Cl (89.9 g/L), KHCO_3 (10.0 g/L), and tetrasodium EDTA (370.0 mg/L)) for the lysis of erythrocytes.

2.5.1. Neutral red (NR) assay

The NR assay was determined according to Repetto et al. (2008) with some modifications. 100 μL of neutral red solution (20 μg neutral red stock solution/mL McCoy's 5a culture medium) were added to each tube. Lymphocyte samples were incubated for 2 h at 37 °C to promote dye uptake by lysosomes. Cells were then washed with 150 μL PBS and then 100 μL of elution medium (Ethanol:Water:AcOH, 50%:50%:1%) were added. The absorbance was read at 540 nm using a microplate reader. The cell viability was calculated according to Eq. (4).

$$\text{cellviability} = \left(\frac{OD_s}{OD_b} \right) \times 100 \quad (4)$$

where OD_s is the optical density of the sample and OD_b is the optical density of the control (cells not treated).

2.5.2. MTT assay

MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl)-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) assay was determined according to Mosmann (1983) with some modifications. 50 μL of MTT solution (1 mg/mL in PBS) were added to each tube containing the lymphocytes. Then, samples were incubated for 3 h at 37 °C and 75 μL of IPA were added for extracting the insoluble product formazan, resulted from the conversion of the MTT dye by viable cells. The number of viable cells in each sample was proportional to the intensity of the absorbance read in an ELISA plate reader at 595 nm. The cell viability was calculated using Eq. (4).

2.6. Statistical analyses

All the experiments were done by triplicate and the results were expressed as means ± SD. TPC, TFC, antioxidant activity and cytotoxicity data were compared using the Tukey and ANOVA test. A Pearson correlation test was performed in order to establish significant effects among the variables: yield, TPC, TFC, antioxidant activity by DPPH and by ABTS assays. Significant levels were defined at $p < 0.05$ and $p < 0.01$. All the analyses were performed using the software SPSS Statistics 17.0 (IBM Corporation, NY, USA).

3. Results and discussion

3.1. Characterization of *Satureja macrostema* extracts

S. macrostema (SM) extracts were obtained by using different concentrations of ethanol in water. The extraction yields in terms of TSS, TPC and TFC, obtained by RE and MUAE techniques, were compared to each other by considering the solvent composition and the extraction time as shown in Table 1.

In terms of extraction yield, the effect of the solvents in RE extracts showed that E75 resulted in the best TSS recovery with a significantly higher TSS content despite the extraction time ($P < 0.05$). Meanwhile MUAE extracts had higher TSS recovery when the ethanol contents in the extraction solvent were 0 and 50% ($P < 0.05$). In both cases, the extraction time did not affect the TSS recovery. On the other hand, *S. macrostema* extracts made with E100 displayed the significantly lowest TSS yield for both extraction techniques. In this case the TSS yield in RE was affected by the extraction time. The highest recovery was achieved after 120 min (Table 1). No significant differences were found among MUAE extracts, displaying the lowest extraction yields ($p < 0.05$).

The effect of the solvent and extraction time was evaluated on the TPC and TFC contents, since these compounds have been considered as responsible for the antioxidant and functional properties of extracts. Results for TPC and TFC for both extraction techniques are shown in Table 1.

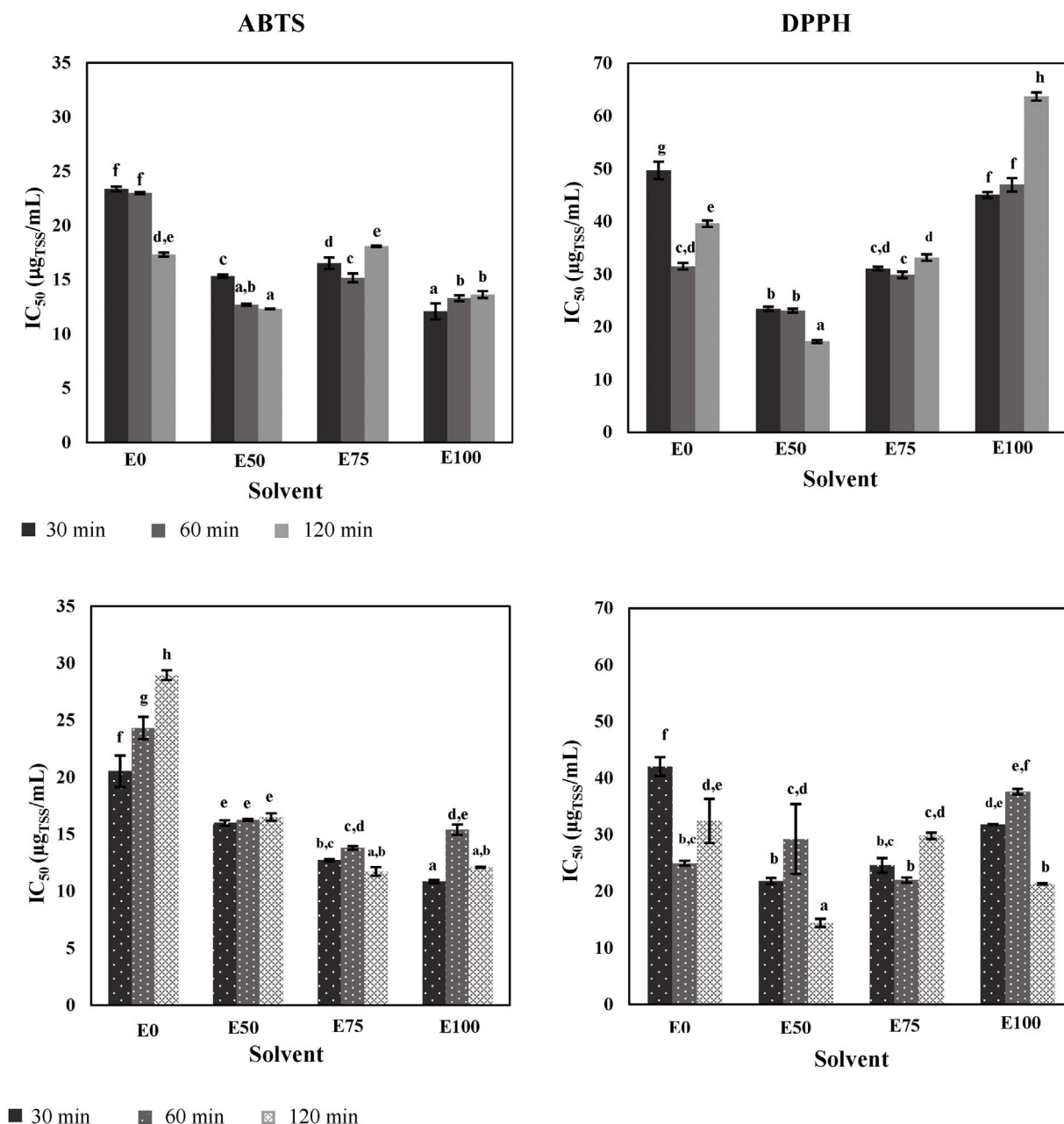


Fig. 2. IC₅₀ values for RE (upper) and MUAE (lower) extracts for ABTS (left-side) and DPPH (right side) radical scavenging. Each column represents the mean ± SD (n = 3). Different letters indicate significant differences (p < 0.05).

The amount of TPC on RE extracts ranged from 96.91 ± 0.48 to 141.69 ± 1.36 mg_{GAE}/g_{TSS} in SM extracts. The solvent effect on TPC extraction showed that ethanol solvents (E50, E75, and E100) displayed the best TPC yield when the extraction time was 60 min. Extraction time of 30 min seems to be insufficient for achieving maximum TPC yields. Extraction time of 120 min showed that TPC values tended to decrease. In the E0 extracts, the higher TPC was achieved at 30 min and then, longer times provided lower TPC values. This behavior is related to the different temperatures reached on the RE extraction: E0 (92 °C), E50 (89 °C), E75 (75 °C), and E100 (74 °C), respectively. The fact that higher temperatures may improve the extraction efficiency of phenolic compounds by increasing their solubility, faster diffusion rates, better mass transfer and extraction yield, reduced solvent viscosity and surface tension (Mokrani and Madani, 2016), may lead to establish that higher temperatures might provide higher phenolic contents. Nevertheless, the time of exposure to high temperatures plays an important role on the deterioration of phenolics. This can be due to

some drawbacks like concurrent degradation of phenolic compounds that were initially mobilized at lower temperatures, the decomposition of residual phenolics remaining in the plant matrix, or even the enhancement of solvent loss through vaporization and enhancement of oxidation reactions (Dent et al., 2013; Mokrani and Madani, 2016).

On the other hand, TFC values of RE extracts displayed that higher TFC was achieved with E100 followed by E50, E75, and finally E0. This may be due to a major affinity of flavonoids to ethanol and aqueous ethanol solvents. The polarity of the solvents of extraction influences the solubility of chemical constituents in the samples and therefore their extraction yield. It is noteworthy that the TFC was lower than the respective TPC in all the cases. According to Sulaiman et al. (2011) this is due to flavonoids are considered to be restricted in distribution and composition in different plant materials in comparison with the overall phenolic compounds.

For MUAE extracts, the TPC and TFC were mainly influenced by the solvent and extraction time condition. Despite the TPC and TFC yields

obtained by MUAE were not significantly higher ($p < 0.05$) than those obtained with RE, it is noteworthy that the temperatures used in MUAE were half of those required in RE. This fact provides an advantage to microwave-ultrasound assisted technique on the extraction of bioactive substances from plant materials. Thus, the best three TPC and TFC recoveries were found in E75–30 min > E100–120 min > E100–60 min for the former content, and E100 at any extraction time without significant differences ($p < 0.05$) for the latter. In almost all the solvents used as longer extraction time was used as higher TPC and lower TFC yields were obtained. Only E75 displayed the opposite behavior for TPC yield, and E100 for TFC yield over time, where no significant differences were observed.

These results are due to the effects of the microwave and ultrasound in the samples. The liquid phase and the cells absorb the irradiation, increasing the kinetic energy of the molecules and consequently causing a faster mass transfer and therefore a higher extraction of the active substances (Alupului et al., 2012). Rashed et al. (2016) reported similar results when cooperative microwave and ultrasound techniques are used for antioxidant compounds, where microwaves-assisted technique can reduce the inner mass transfer restrictions while ultrasound-assisted technique basically reduces the external transport limitations and can break cell membranes reducing control of inner mass transport, in addition to the mutually reinforcing effect of the temperature and the polarity of solvent mixture. Meanwhile the expected performance of the conventional technique (reflux) depended only on the solvent boiling temperature and the polarity of the solvent mixture to pass into the cell plant and dissolved the cell components. Moreover, the advantage of using temperatures under the boiling point of the extraction solvent makes the extraction of bioactive compounds better or high enough to be compared with traditional extraction methods that use boiling solvent conditions (Mandal et al., 2007). On the other hand, longer times of exposure to microwaves and/or ultrasonic irradiation of any biological material may display negative side effects like oxidation, degradation, and/or polymerization of the phenolic compounds or flavonoids contained therein (Novak et al., 2008; Garofulić et al., 2013; Zheng et al., 2016).

3.2. Antioxidant activity of SM extracts

In order to evaluate the functional activity of the SM extracts, the ABTS and DPPH assays were performed and the IC_{50} for the RE and MUAE extracts are shown in Fig. 2. For RE extracts (upper figures), the significantly higher antioxidant activity ($p < 0.05$) was displayed by E50–120 min followed by E50–30 min and E50–60 min for both ABTS and DPPH assays. The extraction solvent used not only influenced the TPC and TFC yields, but also the antioxidant activities of the extracts. For instance, the best antioxidant activity on RE extracts was displayed by E50 > E75 > E100 > E0 for ABTS and E50 > E75 > E0 > E100 for DPPH, respectively. The extraction time showed a significant

effect mainly on E50 extract, where longer extraction times had better antioxidant activities with lower IC_{50} values ($12.31 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$ for ABTS and $17.02 \pm 0.26 \mu\text{g/mL}$ for DPPH). There were several differences on the antioxidant activity behavior between the assays used, mainly on the E0, E75, and E100 extracts. These differences could be related to the chemical nature of the bioactive substances contained in each extract, and to the nature of the radical used for measuring this property, as will be discussed later.

For MUAE extracts (lower figures), the antioxidant activities were highly dependent on the assay used. For instance, ABTS assay showed that E100–30 min, E100–120 min and E75–120 min had better antioxidant activity due to their lower IC_{50} value (averaging $11.56 \pm 0.59 \mu\text{g}_{\text{TSS}}/\text{mL}$), whereas E50–120 min with an IC_{50} value of $14.40 \pm 0.69 \mu\text{g}_{\text{TSS}}/\text{mL}$ was the treatment with higher antioxidant activity for DPPH assay.

These differences on ABTS and DPPH data for the same samples can be attributed to differences in the polarity of the solvents that affect the main mechanisms of electron transfer involved in both assays. This means that ABTS radical cation ($\text{ABTS}^{\cdot+}$) is reactive towards most antioxidants, and it is soluble in both aqueous and organic solvents, and it can be applied over a wide pH and/or ionic strength range. Whereas DPPH assay is based mainly on the electron transfer reaction, and the interactions between antioxidants-DPPH· radicals are also determined by the structural conformation of the antioxidants. Thus, some compounds react very rapidly with DPPH·, reducing the number of DPPH· molecules in correspondence to the number of available hydroxyl groups in the antioxidant compound (Martysiak-Zurowska and Wentka, 2012). Nevertheless, reactions seem to be slower in most of the antioxidants, causing disparity between both techniques (Brand-Williams et al., 1995).

Hence, the DPPH method yielded higher IC_{50} values than those found on ABTS assay and consequently lower antioxidant activity, probably because it has more limitations and in some matrices lower sensitivity, and slower radical-antioxidant reaction rates than in ABTS assay. Thus, *S. macrostema* extracts contain diverse types of phenolic compounds whose extraction is directly related to the compatibility of the compounds with the solvent system, and the antioxidant activity is a result of the reaction of the sum of the individual components of the substrate with the free radical molecule used for the assay (Molyneux, 2004; García-Márquez et al., 2012).

3.3. Pearson correlation analysis

In order to better appreciate the relationships between the antioxidant activities, phenolic and flavonoid contents, Pearson correlation assays under RE and MUAE extraction conditions were analyzed.

Under the variable of “solvent” for RE extracts (Table 2), correlations between solvent, Yield and ABTS were negative and highly

Table 2
Pearson correlation coefficients between different assays^a under influence of extraction conditions ($n = 3$)^b.

	RE extracts					MUAE extracts				
	Yield	TPC	TFC	DPPH	ABTS	Yield	TPC	TFC	DPPH	ABTS
Solvent	−0.669**	0.648**	0.639**	0.245 ^{ns}	−0.727**	−0.729**	0.845**	0.929**	−0.178 ^{ns}	−0.883**
Time	0.097 ^{ns}	−0.386**	0.034 ^{ns}	0.070 ^{ns}	−0.161 ^{ns}	0.056 ^{ns}	0.123 ^{ns}	−0.185 ^{ns}	−0.308 ^{ns}	0.154 ^{ns}
Yield		−0.339*	−0.889**	−0.681**	0.472**		−0.465**	−0.729**	−0.192 ^{ns}	0.481**
TPC			0.259 ^{ns}	−0.142 ^{ns}	0.577**			0.795**	−0.341**	0.753**
TFC				0.471**	−0.510**				−0.088 ^{ns}	−0.877**
DPPH					0.108 ^{ns}					0.235 ^{ns}

^a TPC, total phenolic compounds, TFC, total flavonoid compounds, DPPH radical scavenging activity, ABTS radical inhibition activity, RE heat reflux extracts, MUAE microwave-ultrasound assisted extracts.

^b Number of replicates.

^{ns} Not significant.

* Significant at $p < 0.05$.

** Significant at $p < 0.01$.

significant ($p < 0.01$). This result suggests that the increase of polarity in the extraction solvent provokes that compounds with antioxidant activity did not have high affinity or were less polar than the solvent. On the other hand, correlations between solvent, TPC and TFC were positive and highly significant ($p < 0.01$). This result means that higher ethanol content promotes the better solubility and recovery of phenolic and flavonoid compounds. The pair of solvent-DPPH correlation was not significant. The same behavior was observed for MUAE extracts. Thus, for both extraction systems, differences on the solvent polarity were appropriated for yielding phenolic and flavonoids.

In the case of “extraction time” (Table 2), this parameter only was correlated negatively to TPC ($p < 0.01$) for RE extracts. This may suggest that due to the higher temperatures used on this technique, longer times cause the degradation of the phenolics and flavonoids contained in these extracts. On MUAE extracts, the extraction time did not have any significant correlation with any variables.

Under “yield” parameter (Table 2), a positive correlation to ABTS was found for both RE and MUAE extracts. This suggests that most of the compounds extracted, contributed to the antioxidant activity of SM extracts. On the other hand, a negative correlation was observed between yield and TFC ($p < 0.01$) and TPC ($p < 0.05$) for RE, and only between yield and TPC for MUAE. This suggests that not all the extracted compounds corresponded to phenolics and/or flavonoids. Probably some of the compounds were polymerized or degraded due to temperature and time extraction conditions.

Concerning the “TPC”, it was positively correlated with ABTS for both RE and MUAE extracts, while “TFC” parameter was negative correlated with ABTS in both cases. Thus, it could be concluded that there are other phenolic compounds different from flavonoids that contribute to the ABTS antioxidant activity of SM extracts. Additionally, a synergism of phenolic compounds with one another, and other compounds with antioxidant activity present in the extract may contribute to the overall observed antioxidant capacity (Mokrani and Madani, 2016). Finally, DPPH did not show a clear trend and only had a significant correlation with TPC on RE extracts. This may be attributed to the drawbacks of the assay and the chemical nature of the active substances contained in SM extracts.

Hence, this information is useful to clarify the relationships between the solvent composition and the extraction technique on the yield of phenolic compounds, flavonoids and their antioxidant activity. Pearson correlation showed that ABTS was the only one technique that had a significantly high correlation with the concentration of TPC. For this reason, the identification of the major components on SM extracts and citotoxic activity was done only for those extracts that yielded significantly higher TPC values and lower IC_{50} for ABTS.

3.4. Identification of major components

The *S. macrostema* extracts chosen for the HPLC analysis were for RE the E50–120 min and E100–30 min for MUAE, respectively. Based on Askun et al. (2012) and Chkhikvishvili et al. (2013) reports, several standard compounds including phenolic acids (trans-ferulic acid, caffeic acid, galic acid, p-coumaric acid, rosmarinic acid, and flavonoids (hesperidin, naringin, naringenin, catechin, eriodictyol, apigenin, and quercetin standards) have been found in some *Satureja* L. species, therefore these compounds were used for identifying the major components on SM extracts. RE was found to be constituted for at least nine different compounds (Fig. 3a) with $t_r = 3.052, 4.708, 6.472, 13.805, 15.497, 20.966, 29.228, 30.553$ and 31.879 min, respectively. On the other hand, MUAE displayed eight different compounds (Fig. 3b) with $t_r = 2.988, 3.076, 4.726, 6.555, 13.855, 15.563, 20.736, 20.146$ min. According to the t_r values, only rosmarinic acid was present in both extracts at $t_r = 15.553 \pm 0.128$ min (peak 5 for RE and peak 6 for MUAE) and also corresponded to the major

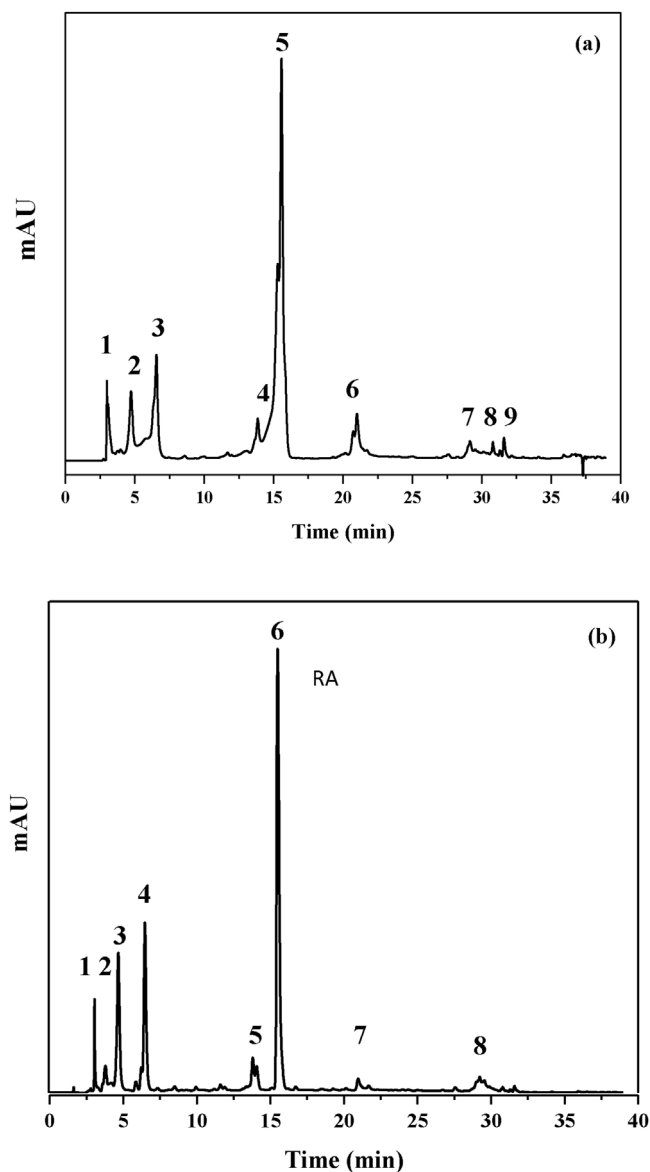


Fig. 3. HPLC chromatograms for SM extracts: a) RE, E50–120 min and b) MUAE, E100–30 min.

component on SM extracts. The concentration of rosmarinic acid was estimated on $605.67 \pm 5.43 \mu\text{g}/\text{g}_{\text{TSS}}$ for RE and $1330.32 \pm 6.29 \mu\text{g}/\text{g}_{\text{TSS}}$ for MUAE extracts. On the other hand, caffeic acid ($t_r = 3.087$ min, peak 1 for RE and MUAE) and chlorogenic acid ($t_r = 4.855$ min, peak 3 for RE and MUAE) were also identified in both extracts, but due to they displayed lower yield recovery as having smaller peak area, rosmarinic acid was used as representative compound for establishing a quantitative recovery. The rest of peaks were not identified with the standards used. From these results, it can be noticed that at the best extraction conditions for RE and MUAE extracts, where the best TPC yields were obtained, the concentration of rosmarinic acid was significantly higher for MUAE extraction technique, suggesting that the mechanisms and extraction variables of the process are better than the extensive use of high temperatures involved on RE extracts, which may promote the degradation of the phenolic compounds from *S. macrostema*. It is worth mentioning, that there are not currently reports about the composition of aqueous or ethanolic extracts of SM, since most of the works reported for the genus *Satureja* have been done on essential oils, where the polar nature of the compounds recovered is different.

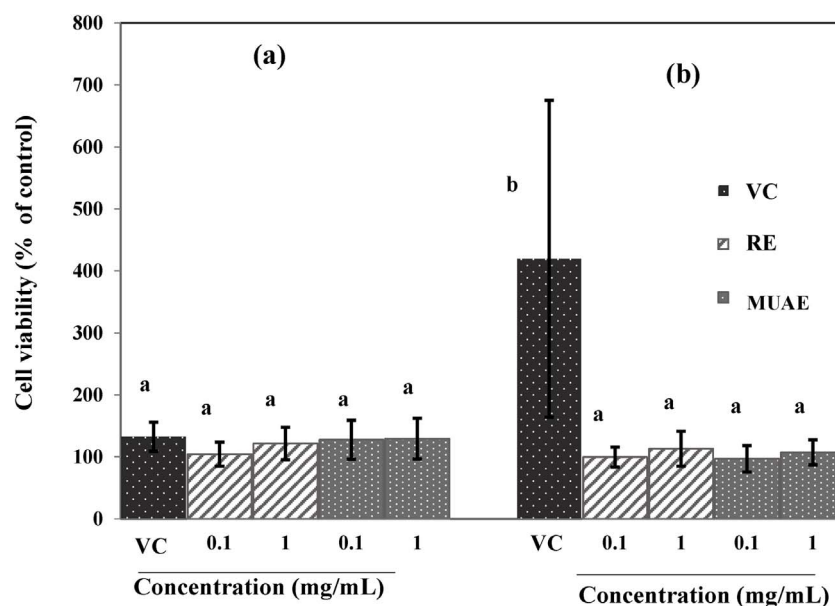


Fig. 4. Effect of different concentrations of extracts E50–120 min (RE), E100–30 min (MUAE) and vehicle control (VC) on lymphocyte cultures. The extracts do not affect lysosome functioning (Neutral Red assay, (a)) and counteract mitochondrial activity induced by the control vehicle DMSO (MTT assay, (b)). Different letter indicates significant differences between treatments ($p < 0.05$).

3.5. In vitro cytotoxicity

The most common tests for evaluating the cytotoxicity are based on cell viability by NR and/or MTT colorimetric assays (Chiba et al., 1998). In order to exclude the possible cytotoxic effect of E50–120 min from RE extract and E100–30 min from MUAE extract, two concentrations of their lyophilized powders (0.1 and 1.0 mg/mL on DMSO 0.5% final concentration) were tested by evaluating cellular metabolic activity on human peripheral blood lymphocyte cultures.

The NR assay is based on the incorporation of the supravital dye into the lysosomes of viable cells; only the living and uninjured cells are able to accumulate and manage the active uptake of neutral red dye (Alkan et al., 2014). Fig. 4a shows that none of the components from the two extracts under testing did not significantly affect cell viability (Tukey, $p > 0.05$). Since lysosomes function is to degrade macromolecules or particles taken from the outside by endocytosis, the relatively high viability value registered in the DMSO control cultures could be due to the toxicity of this solvent though the difference was not significantly.

Fig. 4b shows the effects of the extract on the mitochondrial activity assessed through the MTT assay. None of the treatments affected lymphocyte viability. However, the DMSO control group significantly increased the viability value (Tukey, $p < 0.05$). Mitochondria are considered as the center of cell metabolism, they become both a source and target of reactive oxygen species (ROS) and DMSO which is widely used at concentrations of 0.5–1.5% as a solvent for various pharmacological agents in both cell culture and *in vivo* studies increasing mitochondrial activity derived intracellular ROS formation (Yuan et al., 2014), which facilitates the electron transference until the tetrazolium acceptors increasing the response in front of MTT (Makita and Sandborn, 1971; Chan et al., 2015). On this basis, the high mitochondrial activity registered in the DMSO control cultures was due to the solvent. It has also been reported that DMSO causes damage to cell viability by changing the cell membrane permeation with time exposure-dependence. In order to discard this effect, human lymphocyte cultures were prepared and exposed to DMSO 0.5% for 0, 24 and 48 h. The MTT assay confirmed that longer exposure times provided higher viabilities (data not shown). Nevertheless, it is worthy to note that the mitochondrial activity in those cultures treated with the extracts remained without being affected. *S. macrostema* extracts are

rich in phenolic compounds and high antioxidant activity may act against the ROS induced by DMSO maintaining their functionality and keeping the cell viability, since it is known that this type of compounds scavenge the ROS derived from cell metabolism. Both assays, neutral red and MTT, show that SM extracts do not induce negative effects to lysosomal or mitochondrial activities on human lymphocyte cell cultures.

4. Conclusions

Ethanollic extracts from *Satureja macrostema* demonstrated to have high phenolic yield and good antioxidant activity with high dependence on the solvent composition and the extraction technique. Microwave-ultrasound assisted technique showed advantages over the reflux extraction. ABTS was the best assay for estimating the radical scavenging activity of SM extracts, displaying high correlations to TPC ($p < 0.01$ and 0.05). E50–120 min for reflux and E100–30 min for microwave-ultrasound assisted, displayed the significant higher TPC and lower IC_{50} values respectively. Rosmarinic acid was found to be the major compound on *S. macrostema* extracts. Despite the extraction technique used, the lyophilized SM extracts do not perform cytotoxic effect neither on mitochondrial nor on lysosomal activities. With this information it is possible to support that the selective extraction from *Satureja macrostema* by appropriate solvents and suitable methods, is important for obtaining bioactive compounds with high phenolic contents and antioxidant activities, without representing harmful effects or damaging the health of consumers, strengthening its traditional use.

Acknowledgement

The authors wish to thank the National Council on Science and Technology of Mexico (CONACyT Project No. 236565) and for scholarship grant of NAC.

References

- Alkan, F.U., Anlas, C., Ustuner, O., Bakirel, T., Sari, A.B., 2014. Antioxidant and proliferative effects of aqueous and ethanolic extracts of *Symphytum officinale* 3T3 Swiss albino mouse fibroblast cell line. *Asian J. Plant Sci. Res.* 4, 62–68.
- Alupului, A., Călinescu, I., Lavric, V., 2012. Microwave extraction of active principles

- from medicinal plants. U.P.B. Sci. Bull. Series B 74, 129–142.
- Askun, T., Tumen, G., Satil, F., Karaarslan, D., 2012. Active constituents of some *Satureja* L. species and their biological activities. *Afr. J. Microbiol. Res.* 6, 4623–4633.
- Beejmohun, V., Fliniaux, O., Grand, E., Lamblin, F., Bensaddek, L., Christen, P., Kovensky, J., Fliniaux, M.A., Mesnard, F., 2007. Microwave-assisted extraction of main phenolic compounds in flaxseed. *Phytochem. Anal.* 18, 275–282.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebenson. Wiss. Technol.* 28, 25–30.
- Chan, S.M., Khoo, K.S., Sit, N.W., 2015. Interactions between plant extracts and cell viability indicators during cytotoxicity testing: implications for ethnopharmacological studies. *Trop. J. Pharm. Res.* 14, 1991–1998.
- Chen, Y., Gu, X., Huang, S., Li, J., Wang, X., Tang, J., 2010. Optimization of ultrasonic/microwave assisted extraction (UMAE) of polysaccharides from *inonotus obliquus* and evaluation of its anti-tumor activities. *Int. J. Biol. Macromol.* 46, 429–435.
- Chiba, K., Kawakami, K., Tohyama, K., 1998. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, TMT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicol. In Vitro* 12, 251–258.
- Chkhikvishvili, L., Sanikidze, T., Gogia, N., Mchedlishvili, T., Enukidze, M., Machavariani, M., Vinokur, Y., Rodov, V., 2013. Rosmarinic acid-rich extracts of summer savory (*Satureja hortensis* L.) protect jurkat T cells against oxidative stress. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2013, 9. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/456253>. Article ID 456253.
- Cortés, A.R., Lara, C.B., Aoki, M.K., 2004. Screening and selection of plants by positive pharmacologic effect on jejunum muscular contractility. *Pharm. Biol.* 42, 24–29.
- Dent, M., Dragović-Uzelac, V., Penić, M., Brnčić, M., Bosiljkov, T., Levaj, B., 2013. The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in dalmatian wild sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. *Food Technol. Biotechnol.* 51, 84–91.
- Do, Q.D., Angkawijaya, A.E., Tran-Nguyen, P.L., Huynh, L.H., Soetaredjo, F.E., Ismadij, S., Ju, Y.H., 2014. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoids content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *J. Food Drug Anal.* 22, 296–302.
- Dragović-Uzelac, V., Garofulić, I.E., Jukić, M., Penić, M., Dent, M., 2012. The influence of microwave-assisted extraction on the isolation of sage (*Salvia officinalis* L.) polyphenols. *Food Technol. Biotech.* 50, 377–383.
- García-Márquez, E., Román-Guerrero, A., Pérez-Alonso, C., Cruz-Sosa, F., Jiménez-Alvarado, R., Vernon-Carter, E.J., 2012. Effect of solvent-temperature extraction conditions on the initial antioxidant activity and total phenolic content of mulite extracts and their decay upon storage at different pH. *Rev. Mex. Ing. Quím.* 11, 1–10.
- Garofulić, I.E., Dragović-Uzelac, V., Jambak, A.R., Jukić, M., 2013. The effect of microwave assisted extraction on the isolation of anthocyanins and phenolic acids from sour cherry *Prunus cerasus* var. *Marasca*. *J. Food Eng.* 117, 437–442.
- Handa, C.L., de Lima, F.S., Guelfi, M.F.G., Georgetti, S.R., Ida, E.I., 2016. Multi-response optimisation of the extraction solvent system for phenolics and antioxidant activities from fermented soy flour using a simplex-centroid design. *Food Chem.* 197, 175–184.
- Ince, A.E., Sahin, S., Sumnu, G., 2014. Comparison microwave and ultrasound-assisted extraction techniques for leaching of phenolics compounds from nettle. *J. Food Sci. Technol.* 51, 2776–2782.
- Ma, Y.Q., Ye, X.Q., Fang, Z.X., Chen, J.C., Xu, G.H., Liu, D.H., 2008. Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts from ultrasonic treatment of Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) peels. *J. Agric. Food Chem.* 56, 5682–5690.
- Makita, T., Sandborn, E.B., 1971. The effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) in the incubation medium for the cytochemical localization of succinate dehydrogenase. *Histochemie* 26, 305–310.
- Mandal, V., Mohan, Y., Hemalatha, S., 2007. Microwave assisted extraction-An innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacogn. Rev.* 1, 7–18.
- Martysiak-Zurowska, D., Wenta, W., 2012. A comparison of ABTS and DPPH methods for assessing the total antioxidant capacity of human milk. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 1, 83–89.
- Mokrani, A., Madani, K., 2016. Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit. *Sep. Purif. Technol.* 162, 68–76.
- Molyneux, P., 2004. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26, 211–219.
- Mosmann, T.T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- Novak, I., Janeiro, P., Seruga, M., Oliveira-Brett, A.M., 2008. Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of Portuguese red grape skins determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal. Chim. Acta* 630, 107–115.
- Odabas, H.I., Koca, I., 2016. Application of response surface methodology for optimizing the recovery of phenolic compounds from hazelnut skin using different extraction methods. *Ind. Crop Prod.* 91, 114–124.
- Ortega-Ortega, T., Vázquez-García, V., 2014. *Satureja macrostema*: situación ambiental, conocimiento local y roles de género. *Madera Bosques* 20, 71–86.
- Perez Gutierrez, R.M., Gallardo Navarro, Y., 2010. Antioxidant and hepatoprotective effects of the metanol extract of the leaves of *Satureja macrostema*. *Pharmacogn. Mag.* 6, 125–131.
- Proestos, C., Komaitis, M., 2008. Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. *Lebenson. Wiss. Technol.* 41, 652–659.
- Rafiee, Z., Jafari, M., Alami, M., Khomeiri, M., 2011. Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from olive leaves; a comparison with maceration. *J. Anim. Plant Sci.* 21, 738–745.
- Rahmanian, N., Jafari, S.M., Wani, T.A., 2015. Bioactive profile dehydration, extraction and application of the bioactive components of olive leaves. *Trends Food Sci. Technol.* 42, 150–172.
- Rashed, M.M.A., Tong, Q., Abdelhai, M.H., Gasmalla, M.A.A., Ndayishimiye, J.B., Chen, L., Ren, F., 2016. Effect of ultrasonic treatment on total phenolic extraction from *Lavandula pubescens* and its application in palm olein oil industry. *Ultrason. Sonochem.* 29, 39–47.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1231–1237.
- Repetto, G., Peso, A.D., Zurita, J.L., 2008. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. Protoc.* 3, 1125–1131.
- Sharmila, G., Nikitha, V.S., Ilaiyarasu, S., Dhivya, K., Rajasecar, V., Manoj Kumar, N., Muthukumar, K., Muthukumar, C., 2016. Ultrasound assisted extraction of total phenolics from *Cassia auriculata* leaves and evaluation of its antioxidant activities. *Ind. Crops Prod.* 84, 13–21.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., Nakamura, T., 1992. Antioxidative properties of xanthin on autooxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agric. Food Chem.* 40, 945–948.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144–158.
- Sulaiman, S.F., Sajak, A.A.B., Ooi, K.L., Supriatno Seow, E.M., 2011. Effect of solvents in extracting polyphenols and antioxidants of selected raw vegetables. *J. Food Compos. Anal.* 24, 506–515.
- Taghvaei, M., Jafari, S.M., Mahoonak, A.S., Nikoo, A.M., Rahmanian, N., Hajitabar, J., Meshginfar, N., 2014. The effect of natural antioxidants extracted from plant and animal resources on the oxidative stability of soybean oil. *LWT – Food Sci. Technol.* 56, 124–130.
- Varalakshmi, K.N., Sangeetha, C.G., Samee, U.S., Irum, G., Lakshmi, H., Prachi, S.P., 2011. In vitro safety assessment of the effect of five medicinal plants on human peripheral lymphocytes. *Trop. J. Pharm. Res.* 10, 33–40.
- Vladimir-Knežević, S., Blažeković, B., Kindl, M., Vradić, J., Lower-Nedza, A.D., Brantner, A.H., 2014. Acetylcholinesterase inhibitory: antioxidant and phytochemical properties of selected medicinal plants of the Lamiaceae family. *Molecules* 19, 767–782.
- Vongsak, B., Sithisarn, P., Mangmool, S., Thongpraditchote, S., Wongkrajang, Y., Gritsanapan, W., 2013. Maximizing total phenolics: total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Ind. Crops Prod.* 44, 566–571.
- Yuan, C., Gao, J., Guo, J., Bai, L., Marshall, C., Cai, Z., Wang, L., Xiao, M., 2014. Dimethyl sulfoxide damages mitochondrial integrity and membrane potential in cultured astrocytes. *PLoS One* 9, e107447.
- Zheng, L.L., Wen, G., Yuan, M.Y., Gao, F., 2016. Ultrasound-assisted extraction of total flavonoids from corArticle ID 8768130n silk and their antioxidant activity. *J. Chem.* 2016, 5. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8768130>. Article ID 8768130.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W., 1999. Determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects in superoxide radicals. *Food Chem.* 64, 555–559.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00194

Matrícula: 2133802116

OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE SATUREJA MACROSTEMA EXTRAÍDOS POR MICROONDAS-ULTRASONIDO Y FLUIDOS SUPERCRÍTICOS Y SU INCORPORACIÓN EN NANOEMULSIONES

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 23 del mes de febrero del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. FERNANDO RIVERA CABRERA
DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO
DR. ANTONIO BERNABE ANTONIO
DR. BENOIT AUGUSTE ROGER FOUCONNIER

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA
DE: NANCY ALONSO CARRILLO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



NANCY ALONSO CARRILLO
ALUMNA

REVISÓ

LIC. JULIO CÉSAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. FERNANDO RIVERA CABRERA

VOCAL

DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO

VOCAL

DR. ANTONIO BERNABE ANTONIO

SECRETARIO

DR. BENOIT AUGUSTE ROGER FOUCONNIER