

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN	3
1.1.- QUÉ SON Y QUÉ INTERÉS PUEDEN TENER LOS ANTIOXIDANTES.	4
1.1.1 SISTEMAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS	5
1.1.2. SISTEMAS ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS	8
1.1.3.- ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.	20
1.2.- LAS PLANTAS AROMÁTICAS COMO FUENTE DE ANTIOXIDANTES NATURALES	27
2.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	31
2.1.- EL TOMILLO COMO FUENTE DE ANTIOXIDANTES.	32
2.2.- EFECTO DEL ÁCIDO SALICÍLICO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ANTIOXIDANTES.	35
2.3.- OBJETIVOS.	37
3.- MATERIALES Y MÉTODOS.	39
3.1.- CULTIVO IN VITRO DE LAS PLANTAS DE TOMILLO.	40
3.2.- TRATAMIENTOS CON ÁCIDO SALICÍLICO.	42
3.3.- OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS A PARTIR DE LAS PLANTAS CULTIVADAS IN VITRO.	42
3.4.- DETERMINACIÓN DE CLOROFILAS Y CAROTENOIDES.	43
3.5.- DETERMINACIÓN DE LOS FENOLES SOLUBLES TOTALES.	44
3.6.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.	44
3.6.1.- CAPACIDAD ATRAPADORA DEL RADICAL DPPH'.	44
3.6.2.- ENSAYO DE DECOLORACIÓN DEL CATION RADICAL ABTS.	45
3.6.3.- DETERMINACIÓN DEL PODER REDUCTOR.	46
3.6.4.- DETERMINACIÓN DEL PODER REDUCTOR/ANTIOXIDANTE FÉRRICO (FRAP).	46
3.6.5.- MÉTODO DE LOS DIENOS CONJUGADOS.	47
3.7. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS INDIVIDUALES MEDIANTE HPLC	48
3.8. TRATAMIENTO DE LOS DATOS	49
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
4.1.- EFECTO DE DIFERENTES DISOLVENTES SOBRE LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES EN PLANTAS DE <i>Thymus membranaceus</i> CULTIVADAS IN VITRO.	51
4.1.1.- CONTENIDO EN CLOROFILAS, CAROTENOIDES Y COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN LOS EXTRACTOS.	51
4.1.2.- DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.	53
4.2.- EFECTO DEL ÁCIDO SALICÍLICO SOBRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN PLANTAS DE <i>Thymus membranaceus</i> CULTIVADAS IN VITRO.	58

PFC07-VPT- Proyecto de investigación de los antioxidantes del tomillo

4.2.1.- VIABILIDAD DE LAS PLANTAS DE <i>Thymus membranaceus</i> CULTIVADAS EN MEDIOS CON ÁCIDO SALICÍLICO.	58
4.2.2.- CONTENIDO EN CLOROFILAS, CAROTENOIDES Y FENOLES SOLUBLES TOTALES PRESENTES EN LOS EXTRACTOS.	62
4.2.3.- DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.	64
4.2.4.- DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES INDIVIDUALES POR HPLC.	68
5.- CONCLUSIONES.	77
6. BIBLIOGRAFÍA.	80

1.- INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN.

1.1.- QUÉ SON Y QUÉ INTERÉS PUEDEN TENER LOS ANTIOXIDANTES.

La oxidación es una de las principales causas de deterioro químico en multitud de productos. En el caso de los alimentos su incidencia da como resultado el sabor rancio de algunos frutos, así como una alteración en el resto de cualidades organolépticas, como color, aroma o textura. La oxidación no sólo modifica la apariencia y/o la aceptación por parte del consumidor de un producto alimenticio, sino que, además, puede provocar el deterioro de las cualidades nutricionales e, incluso, afectar a la seguridad de los alimentos.

Los antioxidantes constituyen un grupo de sustancias que, cuando están presentes en bajas concentraciones (en relación con otros compuestos oxidables), inhiben o retrasan los procesos oxidativos, a través de un mecanismo que suele conllevar su propia oxidación. Los suplementos antioxidantes, o los alimentos que contienen antioxidantes, pueden ser usados para reducir los daños oxidativos relacionados con la edad y con enfermedades como la arteriosclerosis, diabetes, cáncer, cirrosis, etc.. Pero las aplicaciones de los compuestos antioxidantes no sólo están restringidas a la industria alimentaria y farmacéutica. Así, se usan para evitar la degradación oxidativa de polímeros, como gomas y plásticos, para evitar la autooxidación de las gasolinas, la decoloración de pigmentos naturales y sintéticos y como aditivos en la industria cosmética (Vaya y Aviram, 2001).

Los compuestos con propiedades antioxidantes empleados en las diferentes industrias, incluida la alimentaria, pueden ser naturales o sintéticos. Entre los antioxidantes sintéticos que más se utilizan en alimentos se encuentran el Hidroxianisol Butilado (BHA) y el Hidroxitolueno Butilado (BHT). Estos compuestos tienen la desventaja de ser muy volátiles y, además, se sospecha que son perjudiciales para la salud. Debido a esto, en la actualidad existe una importante presión por parte de los consumidores que incentiva la utilización de productos que provengan de fuentes naturales y que sean

obtenidos por tecnologías no contaminantes (Valenzuela y Nieto, 1995; Damechki et al., 2001).

De acuerdo con la base de datos de compuestos fitoquímicos del Departamento de Agricultura de los EE.UU., el número de antioxidantes diferentes en una misma planta puede llegar a alcanzar los 40, aproximadamente. Así, por ejemplo en la soja se han identificado 42 compuestos con propiedades antioxidantes, 36 en el té, 35 en el hinojo, 34 en el orégano, 32 en la cebolla, etc.) (USDA, 2003). En esta misma base de datos se cataloga como plantas con los mayores contenidos en antioxidantes al nogal, la nuez de areca, la guayaba, el coco y otras especies menos conocidas.

Los diferentes compuestos con propiedades antioxidantes se encuentran distribuidos por los diversos compartimentos celulares. Su principal misión es controlar el daño oxidativo provocado por diferentes compuestos. Estos sistemas antioxidantes tienden a impedir, fundamentalmente, la formación de especies activas del oxígeno y del nitrógeno (EAO/EAN), sobre todo de los radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) mediante la eliminación de sus precursores: los radicales superóxido y el peróxido de hidrógeno (Hui, 1996). En general, los sistemas antioxidantes se engloban en dos grandes grupos: sistemas enzimáticos y metabolitos de bajo peso molecular (Halliwell y Gutteridge, 1989).

1.1.1 SISTEMAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

Los principales sistemas antioxidantes enzimáticos en plantas están constituidos por las enzimas superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1), ascorbato peroxidasa (APX; EC 1.11.1.11) y catalasa (CAT; EC 1.11.1.6; Mittler *et al.*, 2004) (Tabla 1.I). La enzima SOD cataliza la conversión del anión superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. En plantas se han identificado tres isoenzimas SOD que difieren entre si en el grupo prostético metálico ligado a la enzima. Una clase contiene cobre y zinc (CuZnSOD) y las otras dos restantes contienen hierro (FeSODs) y manganeso (MnSODs), respectivamente. En cuanto a su localización, las FeSODs se encuentran únicamente en el cloroplasto, las MnSODs se localizan principalmente en las

mitocondrias y las CuZnSODs se encuentran en el cloroplasto, citosol, apoplasto y peroxisomas. El H_2O_2 generado por la SOD es eliminado por las enzimas CAT y APX.

La CAT (peróxido de hidrógeno: peróxido de hidrógeno oxidoreductasa) es una metaloproteína tetramérica, cuyo peso molecular oscila entre 210-280 kDa. La CAT cataliza la conversión de dos moléculas de H_2O_2 en H_2O y O_2 . A nivel celular se encuentra en los peroxisomas y, al menos en el maíz, también se encuentra en mitocondrias (Prasad, 1997). El número de recambio de esta enzima es muy elevado (200.000 ciclos catalíticos $\times s^{-1} \times$ subunidad), pero su afinidad por el H_2O_2 es muy baja y, en consecuencia ciertos niveles de H_2O_2 permanecen en la célula.

La APX es capaz de eliminar bajas concentraciones de H_2O_2 debido a su elevada afinidad por éste. La APX es una hemoperoxidasa que utiliza el ascorbato como dador de electrones para llevar a cabo la reducción del H_2O_2 . A nivel celular se encuentra, fundamentalmente, en cloroplastos, citosol y peroxisomas (Shigeoka *et al.*, 2002) aunque también se ha localizado en algunas especies en el apoplasto (Vanacker *et al.*, 1998).

Junto con las actividades de las enzimas CAT y APX, el ciclo ascorbato/glutación (también denominado ciclo de Halliwell-Asada) participa, asimismo, en la eliminación de H_2O_2 en células vegetales (Asada, 1984). Este ciclo consiste en una serie de reacciones redox acopladas en las que intervienen cuatro actividades enzimáticas: APX, monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), dehidroascorbato reductasa (DHAR) y glutación reductasa (GR; EC 1.6.4.2) (Foyer y Halliwell, 1976; Asada 1984). En este ciclo, el peróxido es eliminado por la actividad APX utilizando el ascorbato como donador de electrones. El monodehidroascorbato (MDHA) formado, y a partir de éste el dehidroascorbato (DHA) resultante por dismutación espontánea, se utilizan para reciclar el ascorbato mediante las actividades enzimáticas MDHAR y DHAR, respectivamente. La actividad MDHAR utiliza el NAD(P)H como donador de electrones mientras que la actividad DHAR regenera el ascorbato utilizando el poder reductor suministrado por el glutación reducido (GSH). A su vez, el glutación oxidado (GSSG) formado, es de nuevo reciclado hasta GSH por la acción de GR en una reacción dependiente de NADPH. El balance global del ciclo es la eliminación del H_2O_2 a expensas del NAD(P)H. El ciclo ascorbato/glutación se ha identificado en el estroma del cloroplasto –donde se considera

que constituye el principal sistema detoxificador de H_2O_2 en el citosol, los peroxisomas y en la matriz mitocondrial (Mittler *et al.*, 2004).

Tabla 1.I.- Principales sistemas antioxidantes enzimáticos presentes en plantas. Adaptado de Mittler (2002) y Mittler *et al.* (2004)

Sistema antioxidante	Localización	Principal EAO
Superóxido dismutasa ($O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} \rightarrow H_2O_2 + O_2$)	Cloroplasto. Citosol. Mitocondria. Peroxisoma. Apoplasto	$O_2^{\bullet-}$
Ascorbato peroxidasa ($2 AA + H_2O_2 \rightarrow 2 MDA + 2H_2O$)	Cloroplasto. Citosol. Mitocondria. Peroxisoma. Apoplasto	H_2O_2
Catalasa	Peroxisoma	H_2O_2
Peroxidasa	Pared celular. Vacuola	H_2O_2
Monodehidroascorbato reductasa [MDA + NAD(P)H \rightarrow AA + NAD(P)]	Cloroplasto. Mitocondria	
Dehidroascorbato reductasa (DHAR) (DHA + 2 GSH \rightarrow AA + GSSG)	Cloroplasto. Mitocondria	
Glutación reductasa (GR) GSSG + NAD(P)H \rightarrow 2 GSH + NAD(P)	Cloroplasto. Mitocondria	
Glutation Peroxidasa ($H_2O_2 + 2 GSH \rightarrow 2 H_2O + GSSG$)	Citosol	H_2O_2 , ROOH
Ferritina (Fe+ P \rightarrow P-Fe)	Citosol. Cloroplasto	
NADPH oxidasa. Oxidasa alternativa (AOX) ($2 e^- + 2 H + O_2 \rightarrow H_2O$)	Mitocondria	
Peroxirredoxina (PrxR) ($2P-SH + H_2O_2 \rightarrow P-S-SP + 2 H_2O$)	Cloroplasto	
Tiorredoxina (Trx) ($P-S-S-P + 2H^+ \rightarrow 2P-SH$)	Cloroplasto	
Glutarredoxina (GLR) (DHA + 2 GSH \rightarrow AA + GSSG)	Cloroplasto. Citosol. Mitocondria	

Otras enzimas implicadas en la eliminación del H_2O_2 y que juegan un importante papel en la protección frente al estrés oxidativo son las guayacol-peroxidases [EC 1.11.1.7] (Prasad, 1996; Takahama, 2004; Passardi *et al.*, 2005). Estas enzimas utilizan múltiples

dadores electrónicos, principalmente compuestos fenólicos, para reducir el H_2O_2 . En células vegetales se han descrito un gran número de isoperoxidasas localizadas en vacuolas y en el apoplasto y debido a sus dos posibles ciclos catalíticos, peroxidativo e hidroxílico, pueden generar EAO, así como regular los niveles de H_2O_2 (Passardi *et al.*, 2005). Además de los sistemas enzimáticos descritos, las células vegetales cuentan con otros sistemas implicados en la eliminación de las EAO y que se describen en la Tabla 1.I.

1.1.2. SISTEMAS ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS

Además de los mecanismos enzimáticos anteriormente mencionados, la célula vegetal dispone de un conjunto de sistemas no enzimáticos que permiten regular y contrarrestar la agresión oxidativa que causan las EAO y otros agentes oxidantes. Estos compuestos neutralizan los radicales libres cediéndoles un electrón y dando lugar a la formación de especies no reactivas. Muchos compuestos podrían servir para este fin teniendo en cuenta que las EAO son extremadamente reactivas, y por tanto son capaces de extraer un electrón de prácticamente cualquier molécula disponible. Sin embargo, un antioxidante biológico eficaz debe hacer algo más que reaccionar con los radicales libres, debe: a) estar presente y tener una concentración adecuada en la célula, b) reaccionar con una gran variedad de radicales libres y, c) ser capaz de regenerarse (Arrigoni y de Tullio, 2000). En las células vegetales existen varios compuestos -tanto de naturaleza hidrosoluble como liposoluble- que cumplen estas propiedades. Los principales antioxidantes de naturaleza hidrosoluble que controlan la homeostasis redox son el ácido ascórbico, el glutatión y diversos compuestos fenólicos y, los liposolubles son los tocoferoles y los carotenoides (ver Tabla 1.II).

Sin embargo, las EAO, en determinadas circunstancias, juegan un papel esencial en la ruta de transducción de señales y en los mecanismos de activación enzimática. Esto indica que la función de los antioxidantes no es la de eliminar por completo las EAO sino la de regular de forma muy precisa los niveles de estas especies. Por tanto, para elucidar la función de estos antioxidantes es esencial identificar los factores que modifican sus niveles, su distribución espacial y el estado redox en la célula.

Tabla 1.II.- Potencial de oxidación-reducción estándar a pH 7, concentración intracelular y constantes de reacción de los principales antioxidantes presentes en células vegetales. Adaptado de Foyer y Noctor (2005)

Par redox	Potencial redox (V)	Rango de concentración (μM)	Constantes cinéticas ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	
			Oxígeno singlete	Superóxido
$\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$	+0.82	200-300(O_2)		
$\text{O}_2/\text{O}_2^{\bullet-}$	-0.30	< 0.001 ($\text{O}_2^{\bullet-}$)		
$\text{O}_2^{\bullet-}/\text{H}_2\text{O}_2$	+0.94	1-100 (H_2O_2)		
$\text{H}_2\text{O}_2/\bullet\text{OH}$	+0.54	Insignificante ($\bullet\text{OH}$)		
$\bullet\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$	+2.20	-		
DHA/AA	-0.10	10.000-20.000	1×10^7	2×10^5
GSSG/GSH	-0.24	2.000-5.000	2×10^6	7×10^5
Carotenoides			1×10^{10}	
$\text{TO}^\bullet, \text{H}^+/\text{TOH}$ (tocoferol)	+0,48		3×10^8	
Kemferol				5×10^5
Cafeico				4×10^5
Quercetina				9×10^4

Ácido ascórbico

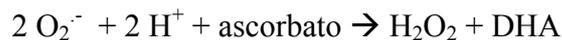
El ácido L-ascórbico (AA) o vitamina C es el antioxidante más abundante en los tejidos vegetales. Su concentración es del orden de milimolar, aunque hay que tener en cuenta que el contenido de AA varía en función del tipo de tejido, del estado fisiológico de la planta, así como de las condiciones medioambientales. Los mayores niveles de AA se

encuentran en tejidos fotosintéticos, frutos y órganos de almacenamiento y su contenido es mayor en tejidos jóvenes que en adultos.

A nivel celular, el AA se encuentra en el citosol, cloroplasto, vacuola, mitocondria y apoplasto. Sus niveles son especialmente elevados en el citosol y en los cloroplastos y su concentración oscila entre 10 y 20 mM, respectivamente (Noctor y Foyer, 1998; Smirnoff, 2000).

La acción antioxidante del AA es bien conocida (ver Figura 1.1). Así, este compuesto:

1) reacciona directamente con $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, y 1O_2 (Buettner y Jurkiewicz, 1996). El AA puede actuar reduciendo al $O_2^{\cdot-}$ dando lugar a H_2O_2 y deshidroascorbato (DHA) de acuerdo con la reacción:



El ascorbato también es un secuestrador eficiente del oxígeno singlete y es capaz de reaccionar con los radicales $\cdot OH$ y con el peróxido de hidrógeno, según la reacción:



2) regenera la vitamina E, mediante la reducción del radical tocoferoxil en un ciclo redox en el cual se transfiere un sólo electrón (Sharma y Buettner, 1993) según la ecuación:



3) es esencial en la protección de enzimas que poseen metales de transición como grupos prostéticos (Padh, 1990).

Por todo ello, el ascórbico se considera un antioxidante muy eficiente aunque no debe ignorarse que en algunas circunstancias, como en presencia de metales traza y en condiciones de pH adecuadas, puede actuar como pro-oxidante e incluso tener efectos mutagénicos (Halliwell, 2001).

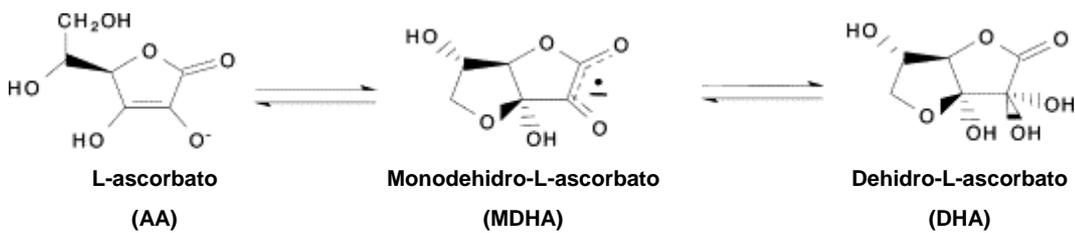


Figura 1.1.- Diferentes estados redox del ascorbato. La forma disociada, el anión ascorbato (AA) es la predominante a pH fisiológico (5-7). El primer producto de la oxidación del AA es un radical libre similar a las semiquinonas denominado monodehidroascorbato (MDHA). El MDHA dismuta espontáneamente a AA y a deshidroascórbico (DHA). Tomado de Potters *et al.* (2002).

Además de su actividad antioxidante, el ácido ascórbico actúa como cofactor de un gran número de enzimas–dioxigenasas implicadas en diversas rutas metabólicas clave y participa en la regulación de diversos procesos celulares como la fotoprotección (ciclo de las xantofilas) y la regulación de la fotosíntesis, la expansión celular y el ciclo celular (Noctor y Foyer, 1998; Arrigoni y de Tullio, 2000; Smirnoff, 2000; Smirnoff y Wheeler, 2000; de Pinto y de Gara, 2004; Potters *et al.*, 2004; Tokunaga *et al.*, 2005). Además, el contenido foliar de ascórbico puede modular la expresión de genes implicados en la defensa vegetal y en el control del desarrollo (Pastori *et al.*, 2003).

Glutación

Otro componente clave de los sistemas antioxidantes es el glutatión (γ -Glu-Cys-Gly; Figura 1.2). El glutatión es un tiol no proteico que se sintetiza a partir de los aminoácidos L-glutámico, L-cisteína y glicina en una ruta dependiente de ATP y catalizada por las enzimas γ -glutamilcisteína sintetasa (EC 6.3.2.2) y glutatión sintetasa (EC 6.3.2.3), respectivamente (Noctor *et al.*, 2002).

La molécula de glutatión puede encontrarse en dos estados de oxidación distintos: en forma reducida, como tiol (GSH) y en forma oxidada, compuesta por dos moléculas unidas por un puente disulfuro (GSSG). En plantas, el glutatión es el principal compuesto de almacenamiento y transporte de azufre orgánico, participa en la

señalización celular y desempeña una importante función de defensa frente a metales pesados y frente a diversos xenobióticos.

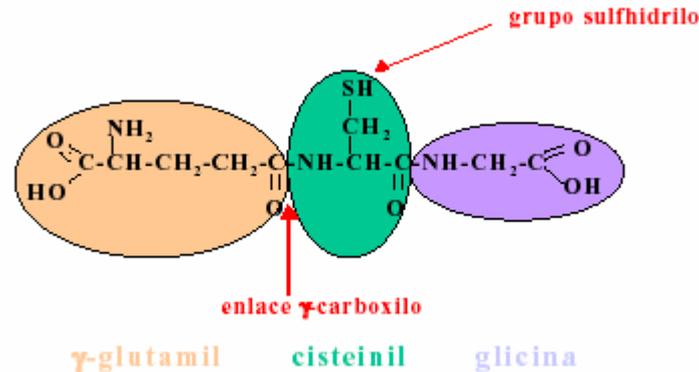


Figura 1.2.- Estructura del glutatión, γ - glutamil-cisteinil- glicina. La fuerte naturaleza nucleofílica de la cisteína hace que el glutatión sea un potente agente reductor.

El GSH es un potente antioxidante, participa en el ciclo AA/GSH implicado en la detoxificación dependiente de NAD(P)H del H_2O_2 y puede reaccionar químicamente con diversas EAO. En todos estos procesos, se produce la oxidación del grupo tiol del GSH a GSSG. La relación celular GSH/GSSG se mantiene gracias a la GR, una flavoproteína monomérica que usa el NADPH para reducir GSSG en dos moléculas de GSH. Como todos los organismos aeróbicos, las plantas mantienen los grupos tioles citoplásmicos en forma reducida (-SH) debido al bajo potencial redox impuesto por las concentraciones del orden de milimolar del GSH que actúa como principal regulador del estado de oxidación de los grupos sulfhidrilo. Aunque la formación de enlaces disulfuro ocurre durante el ciclo catalítico de algunas enzimas, la formación de puentes disulfuro proteicos estables es rara, excepto en tejidos quiescentes como las semillas. Las múltiples funciones desempeñadas por el GSH en la célula, junto con la estabilidad del GSSG, hace que éste par redox sea muy adecuado para la transducción de la información. Se ha sugerido que es la relación GSH/GSSG la que influye en el control de la expresión génica y en la función de las proteínas más que el contenido absoluto del *pool* de glutatión (Foyer y Noctor, 2005).

Tocoferoles

Los tocoferoles (vitamina E) son antioxidantes lipófilos que se localizan exclusivamente en los plastos y su biosíntesis se ha observado sólo en plantas, y en algunas algas y cianobacterias. Los cuatro tipos de tocoferoles sintetizados (α , β , γ y δ) difieren únicamente en la posición de los sustituyentes metilados del anillo cromanol (Figura 1.3). Todos los tocoferoles son moléculas anfipáticas, con una cola hidrofóbica asociada a las membranas y una cabeza polar que permanece en la superficie de éstas. En plantas, los tocoferoles se sintetizan y acumulan en los plastos (Arango y Heise, 1998).

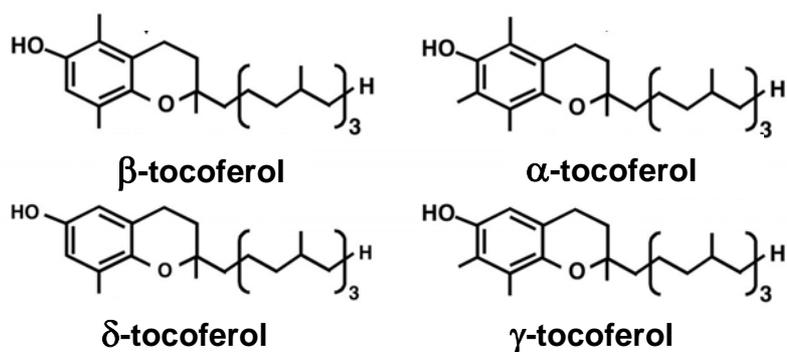


Figura 1.3.- Estructura del α -, β -, γ -, y δ - tocoferol. Estos compuestos constan de un anillo hercíclico cromanol con uno (δ - tocoferol), dos (β -tocoferol o el γ -tocoferol) o tres grupos metilos (α -tocoferol).

Los tocoferoles interactúan con los grupos acilos de los lípidos poliinsaturados, estabilizan las membranas y secuestran y atenúan varias EAO, especialmente $^1\text{O}_2$ y $\bullet\text{OH}$. La atenuación (*quenching*) del $^1\text{O}_2$ por tocoferoles es muy efectiva, y se ha estimado que una sola molécula de α -tocoferol es capaz de neutralizar hasta 120 moléculas de oxígeno singlete antes de ser degradada. Debido a la estructura del anillo cromanol, los tocoferoles son capaces de donar un electrón y formar un radical tocoferoxil estable, lo que contrasta con otros antioxidantes fenólicos, como hidroquinonas, que deben donar dos electrones para adquirir una estructura estable. Los radicales tocoferoxilo pueden donar un segundo electrón, lo que provoca la apertura del anillo cromanol y la formación de la correspondiente tocoferol quinona, que también participa en las reacciones de transferencia electrónica (Liebler, 1998).

Los tocoferoles, además, también actúan como terminadores reciclables de las reacciones en cadena de los radicales de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) generados durante la oxidación de lípidos. Los tocoferoles secuestran los radicales peroxilo lipídicos y el radical tocoferoxil formado puede ser reciclado a tocoferol por ascorbato. Esta propiedad permite a la molécula de tocoferol participar como terminador en muchas reacciones de peroxidación antes de ser degradado. Estudios en animales muestran que el tocoferol participa en la modulación de las rutas de transducción de señales y en la transcripción (Clement *et al.*, 2002; Nobata *et al.*, 2002). En plantas debe determinarse si los tocoferoles desempeñan las mismas funciones que en animales.

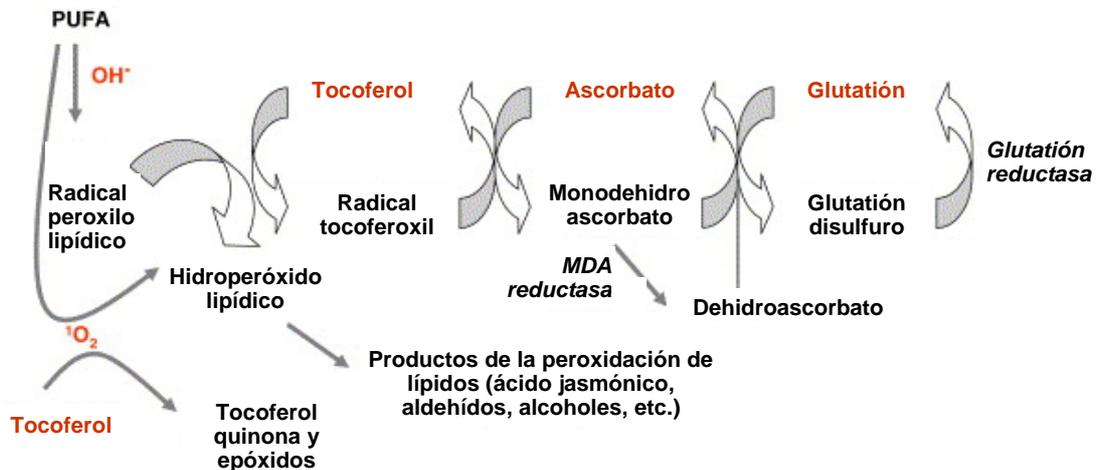


Figura 1.4.- Eliminación de EAO por α -tocoferol. El α -tocoferol, el ascorbato y el glutati3n interactúan para limitar la peroxidaci3n de lípidos en el cloroplasto. El α -tocoferol también puede desactivar al 1O_2 .

Carotenoides

Los carotenoides son isoprenoides de 40 átomos de carbono que tienen una estructura lineal con grupos metilo laterales cada 4 carbonos y pueden llegar a tener hasta 15 sistemas de dobles enlaces conjugados. Los carotenoides se sintetizan y acumulan en los plastos. Por sus propiedades bioquímicas, los carotenoides son esenciales en la fotosíntesis. En todos los organismos fotosintéticos, los carotenoides desempeñan dos funciones principales. Por una parte, actúan de antenas alternativas absorbiendo luz no accesible a la clorofila (la comprendida entre 420–500 nm). Por otra, impiden la foto-

oxidación del aparato fotosintético mediante la extinción (*quenching*) del estado triplete de las moléculas de clorofila y la eliminación de EAO que se generan en el cloroplasto como consecuencia de las reacciones primarias de la fotosíntesis (Woodall *et al.*, 1997). Además, las xantofilas permiten la disipación térmica del exceso de energía mediante un proceso que no se canaliza a través de procesos fotoquímicos conocido como *quenching* no fotoquímico. Esta capacidad fotoprotectora parece estar relacionada con la interconversión cíclica de violaxantina en zeaxantina mediante un proceso de desepoxidación dependiente de ascorbato (Demmig-Adams *et al.*, 1996).

Debido al gran número de sistemas de dobles enlaces conjugados (Figura 1.5), los carotenoides pueden reaccionar con un gran número de compuestos electrofílicos. Estas reacciones van a depender de la longitud de la cadena polieno y de la naturaleza de los grupos terminales. En estudios realizados *in vitro*, se ha comprobado que los carotenoides son potentes antioxidantes capaces de secuestrar diversos radicales libres. Así, se ha comprobado que los carotenoides son los compuestos naturales más efectivos en el atrapamiento del $^1\text{O}_2$, con una constante cinética media de $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Además, cuando los niveles de O_2 son bajos, son capaces de secuestrar radicales peroxilo impidiendo, de esta forma, la peroxidación lipídica de las membranas. En primera instancia se formaría un radical intermediario de carbono, ej., ROO-Car^\bullet y, en una reacción posterior, el radical puede secuestrar otro radical peroxilo formando un aducto neutro OO-Car-OOR . Sin embargo, a elevadas concentraciones de O_2 los radicales intermediarios de los carotenoides pueden adicionar oxígeno y formar radicales peroxilo como Car-OO^\bullet o $\text{ROO-Car-OO}^\bullet$. Estas especies podrían actuar como pro-oxidantes e iniciar, por ejemplo, el proceso de peroxidación lipídica (van den Berg *et al.*, 2000).

Otro papel adicional de los carotenoides es el de proporcionar distinta pigmentación – amarilla, anaranjada y roja- a flores y frutos. Mientras que los tejidos fotosintéticos contienen cantidades significativas de β -caroteno, luteína, violaxantina y neoxantina, en los cromoplastos de flores y frutos se acumulan otros tipos de carotenoides de muy diversa naturaleza. Así, en los cromoplastos de frutos maduros de pimiento se acumulan capsantina y casorubina y en frutos de tomate licopeno (van den Berg *et al.*, 2000). Por otro lado, los carotenoides son los precursores del ácido abscísico, una fitohormona que

parece estar implicada en los procesos de adaptación de las plantas a diversos tipos de estrés (Zhu 2002; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2005).

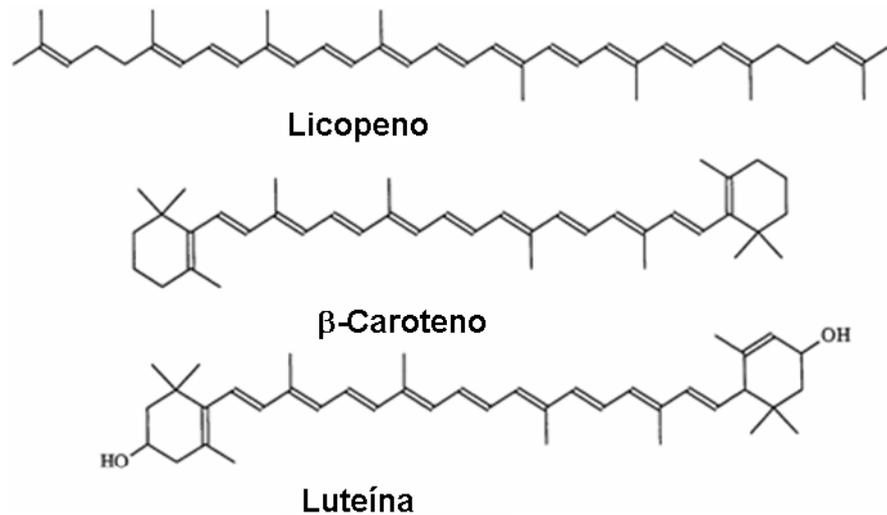


Figura 1.5.- Estructura química de algunos carotenoides. Los extremos de la molécula de un carotenoide pueden formar anillos o llevar sustituyentes oxigenados. Los carotenoides con algún grupo oxigenado se denominan xantofilas (ej., luteína), mientras que los hidrocarburos puros son los carotenos (ej., β -caroteno). Poseen en su estructura sistemas de dobles enlaces conjugados (es decir, dobles enlaces alternados con sencillos) que se extienden por gran parte de la molécula.

Compuestos fenólicos

Los fenoles son compuestos químicos que se caracterizan por poseer al menos un anillo aromático sustituido con uno, o varios, grupos hidroxilo. A la hora de definir los compuestos fenólicos, es preferible atender a consideraciones de origen biosintético, definiéndose estas sustancias como aquellas derivadas de dos rutas principales: La ruta del ácido siquímico, que da lugar a la formación de fenilalanina y, a través del metabolismo fenilpropanoide general, de fenilpropanos y derivados (Figura 1.6.), y la del acetato-malonato, que puede originar fenoles simples y quinonas (Harborne, 1989). La combinación de ambas rutas principales da lugar a la formación de los flavonoides, que es el subgrupo de compuestos fenólicos que presenta mayor diversidad y una distribución más amplia en el Reino Vegetal.

Dentro de los compuestos fenólicos se pueden establecer varios subgrupos atendiendo al número de átomos de carbono y a la estructura del esqueleto fenólico básico. Así, por ejemplo, la estructura de los flavonoides está basada en un esqueleto tipo flavona C₆-C₃-C₆ y la de los ácidos hidroxicinámicos forma parte de la clase de compuestos C₆-C₃, denominados fenilpropanoides. La química de los compuestos fenólicos se ve complicada aun más por el hecho de que la mayoría de éstos compuestos se presentan en forma conjugada, principalmente con una o varias moléculas de azúcar unidas a través de los grupos hidroxilo, lo que añade mayor complejidad a la hora de caracterizar químicamente estos compuestos (Harborne, 1989).

Dentro de una misma planta los compuestos fenólicos se encuentran presentes en, prácticamente, todas las partes de la misma. Sin embargo, la distribución de estos compuestos no suele ser uniforme ni desde un punto de vista cualitativo ni cuantitativo. Por ejemplo, los frutos son especialmente ricos en ácidos cinámicos (Meyer *et al.*, 1998) y flavanoles. A nivel subcelular, los compuestos fenólicos se acumulan en forma soluble principalmente en las vacuolas (Yamaki, 1984) con relativamente pequeñas cantidades en el espacio libre apoplástico, estando ausentes, debido a su alta reactividad, del citoplasma. Sin embargo, estos compuestos también pueden presentarse ligados a determinadas estructuras subcelulares, como es el caso de la pared celular, donde se acumulan las ligninas y algunas moléculas simples, derivadas de los ácidos hidroxicinámicos y flavonoides (Robards *et al.*, 1999). En frutos de tomate, por ejemplo, la mayoría de los compuestos fenólicos se encuentran en la cutícula.

La síntesis y la acumulación de los compuestos fenólicos están condicionadas por el estado de desarrollo general de la planta o de los órganos, tejidos y células considerados. El control de estos procesos, que determinan en última instancia la distribución de estos metabolitos secundarios, viene determinado por factores de tipo endógeno relacionados con los procesos de diferenciación dependientes del desarrollo y/o por factores externos tales como la luz, la temperatura o los ataques de agentes bióticos o abióticos (Wiermann, 1981).

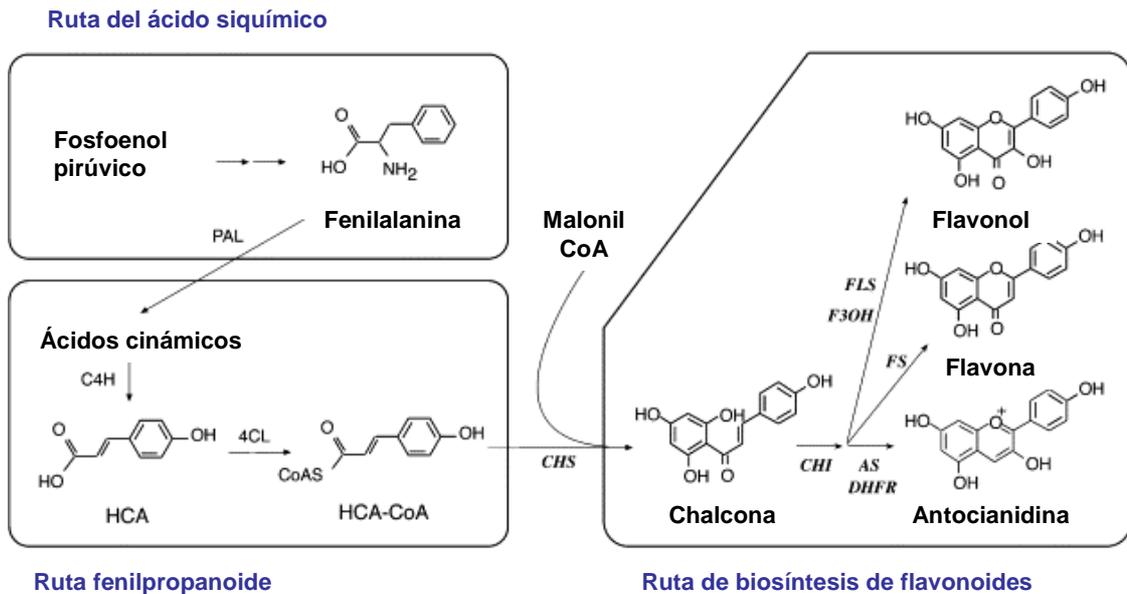


Figura 1.6.- Ruta biosintética de compuestos fenólicos. Los ácidos hidroxicinámicos (HCAs) y los flavonoides derivan de los ácidos cinámicos, que se forman a partir de la fenilalanina por la acción de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL). Los ácidos cinámicos son transformados en HCA por la enzima cinamato-4-hidroxilasa (C4H) y por la *o*-metiltransferasa. La enzima 4-cumarato:CoA ligasa (4CL) cataliza la formación de hidroxicinamoil CoA (HCA-CoA) y este intermediario activado se emplea en la biosíntesis de flavonoides y ligninas. La síntesis de flavonoides comienza con la condensación de HCA-CoA con 3 moléculas de malonil CoA catalizada por la enzima chalcona sintasa (CHS). La chalcona formada puede ser convertida en diversos productos finales como flavona, flavonol y antocianina por diversas enzimas como chalcona isomerasa (CHI), flavanona 3-hidroxilasa (F3OH), isoflavona sintasa (ISF), flavona sintasa (FS), flavonol sintasa (FLS), dihidroxiflavonol reductasa (DHFR) y antocianina sintasa (AS). Adaptado de Sakihama *et al.* (2002).

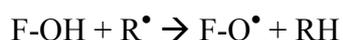
En situaciones de estrés se produce una acumulación de compuestos fenólicos y, dado el carácter antioxidante de éstos, se ha sugerido que los fenoles desempeñan un papel protector celular clave en estas circunstancias (Dixon y Paiva, 1995). Así, los derivados de hidroxicinamatos y los flavonoides han sido implicados en la protección frente a la peroxidación de los lípidos, proceso que conllevaría la rotura de membranas y la pérdida de compartimentación, y por tanto la funcionalidad de la célula (Rice-Evans *et al.*, 1997).

El mecanismo de protección de lípidos por los polifenoles ocurre en el estado inicial y, más efectivamente, durante el estado de propagación de la oxidación lipídica por captura de los radicales libres (R), inhibiendo de esta manera la reacción en cadena. La transferencia de electrones desde el radical libre (R) determina que el antioxidante se

transforme en una molécula radical activa y este radical así formado debe ser lo suficientemente estable para que la función antioxidante sea efectiva. A su vez, el radical formado puede ser recuperado por otras sustancias antioxidantes, como el ascorbato. En este sentido, se ha sugerido que los compuestos fenólicos podrían participar, en conjunción con el ácido ascórbico y, posiblemente otros reductores, y junto con la enzima peroxidasa, en un sistema encargado de regular el estado redox de la célula (Takahama, 1998).

Otros mecanismos por los que los compuestos fenólicos expresan su carácter antioxidante serían la quelatación de metales de transición (en el caso de aquellos fenoles que poseen en su estructura grupos carboxilo u o-dihidroxilo) e, incluso, también ha sido descrita su acción antioxidante como consecuencia de la inhibición de enzimas prooxidantes, como la lipooxigenasa (Decker, 1995).

La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos se debe a su bajo potencial redox ($0.23 < E_7 < 0.75V$). Por ello, son termodinámicamente capaces de inactivar de forma efectiva las EAO, como el anión superóxido y los radicales peroxilo, alcoxilo e hidroxilo, cuyo potencial de reducción se encuentre en el rango de 2.13-1.0 V, mediante la donación de un protón:



donde R^{\bullet} representa al anión superóxido y los radicales peroxilo, alcoxilo e hidroxilo.

El radical aroxilo ($F-O^{\bullet}$) puede reaccionar con un segundo radical, adquiriendo una estructura quinona estable (Figura 1.7). Los radicales aroxilo pueden reaccionar con el oxígeno, generando quinonas y anión superóxido. Esta última reacción puede tener lugar en presencia de elevados niveles de metales de transición y éstos son los responsables de los efectos pro-oxidantes de los flavonoides. Por tanto, la capacidad antioxidantes de los flavonoides, o fenoles en general, depende no sólo del potencial redox del par $F-O^{\bullet}/F-OH$, sino también de las posibles reacciones posteriores de los radicales aroxilo.

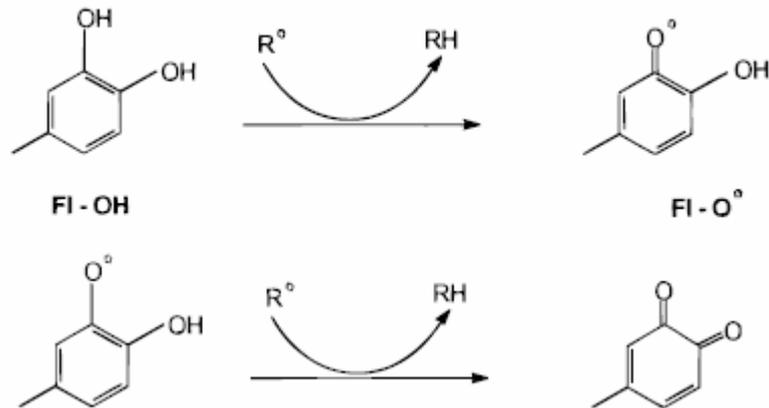


Figura 1.7.- Secuestro de EAO (R•) por flavonoides. Tomado de Pietta (2000).

Dada la gran diversidad encontrada en lo que respecta a la naturaleza de los sistemas antioxidantes no enzimáticos, el número de contribuciones científicas acerca de aspectos como la extracción, separación y análisis de estos compuestos ha aumentado considerablemente en los últimos años. Resulta de particular interés a la hora de caracterizar la actividad antioxidante de un extracto, tener en cuenta el método analítico empleado para determinar esta actividad, ya que ello puede aportar información acerca del tipo de compuestos presentes en dicho extracto y su aplicación potencial en la industria.

1.1.3.- ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

Para analizar los antioxidantes presentes, en cualquier material vegetal, se utilizan gran diversidad de metodologías. Algunas de las más comúnmente utilizadas se describen en este apartado.

La interpretación de los resultados obtenidos a partir de medidas de la actividad antioxidante realizadas *in vitro* debe realizarse con mucha cautela, ya que el efecto antioxidante de los compuestos ensayados puede variar considerablemente en función

del método empleado y de las condiciones en que se haya llevado a cabo el ensayo. Como criterio general, a la hora de seleccionar un método de análisis es de suma importancia tener en cuenta la aplicación (o función fisiológica) prevista (o conocida) del antioxidante.

Los métodos para ensayar la actividad antioxidante de una muestra pueden ser clasificados, en principio, en dos categorías: 1) Aquellos métodos que miden la capacidad para ceder un electrón (o un átomo de hidrógeno) a una EAO específica o a cualquier otro aceptor electrónico; y 2) métodos que determinan la capacidad para eliminar la fuente de inicio del proceso oxidativo, por ejemplo, inhibición de enzimas, quelatación de metales de transición, absorción de luz UV, etc. (Vaya y Aviram, 2001).

Los antioxidantes naturales son, a menudo, multifuncionales y la actividad y el mecanismo de acción dominantes en un sistema de ensayo particular dependen de las condiciones de ensayo, que afectan tanto a la cinética de las reacciones, como a la composición del sistema. La efectividad de los antioxidantes en sistemas biológicos o en sistemas modelo multifásicos se ve afectada por muchos factores. Entre los principales se incluye el reparto de los compuestos entre las fases del sistema, las condiciones de oxidación y el estado físico del sustrato oxidable (Frankel y Meyer, 2000).

Para entender y predecir mejor cómo los antioxidantes naturales ejercen su acción beneficiosa es necesario tener en cuenta todos los factores que pueden influir sobre un ensayo de determinación de la actividad antioxidante. Debido, precisamente, a ese alto número de factores condicionantes, parece claro que no es muy apropiado utilizar un único ensayo para valorar el potencial antioxidante de un compuesto o de una mezcla compleja de compuestos. Por ello es de suma importancia la selección de los métodos a aplicar.

A continuación se describen algunos de los ensayos habitualmente utilizados en la determinación de la capacidad antioxidante de compuestos aislados o de mezclas de compuestos.

Ensayo del radical DPPH

El radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (Figura 1.8) fue uno de los primeros radicales sintéticos utilizados para estudiar la relación estructura-actividad de los antioxidantes fenólicos. El método se basa, en el descenso de absorbancia a 517 nm, asociado a la desaparición de la forma radical del DPPH, de los medios de reacción provocada por antioxidantes.



Se considera que el punto final del ensayo se alcanza cuando la absorbancia se mantiene constante. Por lo tanto, el tiempo de ensayo puede variar desde unos minutos, hasta algunas horas dependiendo del tipo y de las concentraciones de los diferentes antioxidantes presentes en las muestras analizadas (Brand-Williams *et al.*, 1995). Este método, con algunas modificaciones (por ejemplo, Kim y Nawar, 1993) se ha utilizado para determinar la eficacia antiradicalaria de multitud de compuestos aislados y productos y/o extractos de naturaleza y origen muy variado (vinos, zumos, compuestos polifenólicos, etc.).

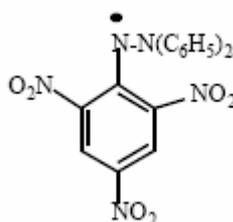


Figura 1.8.- Estructura del radical DPPH.

Decoloración del catión radical ABTS

Según la metodología desarrollada por Re *et al.* (1999) y descrita por Kusoski *et al.* (2004), el catión radical del 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato (ABTS^{•+}) se obtiene tras la reacción del ABTS (Figura 1.9) con persulfato potásico, tras incubarlo a temperatura ambiente (25°C) y en la oscuridad durante 16 h. El método descrito es

factible debido a que el $ABTS^{++}$ es un radical con una larga vida media. De hecho, el método original para generarlo estaba basado en una oxidación de tipo enzimático, usando metamioglobina, peroxidasa y H_2O_2 como iniciadores (Miller *et al.*, 1993). Este método presenta algunos inconvenientes debido a posibles interacciones entre el producto de la oxidación de la metamioglobina y los reductores presentes en las muestras. En cualquier caso, sea cual sea el método utilizado para la generación del radical, el ensayo de la actividad antioxidante utilizando este compuesto se basa en la decoloración de la disolución de $ABTS^{++}$ determinada espectrofotométricamente a 734 nm, debida a la reducción del catión radical por los compuestos dadores de electrones presentes en las muestras ensayadas.

El tiempo de incubación de la solución de $ABTS^{++}$ con la muestra se suele situar entre 1 y 7 minutos. Los resultados obtenidos por algunos investigadores indican que la reacción con el radical $ABTS^{++}$ no se completa hasta pasado 1 minuto, y según Re *et al.* (1999) el tiempo de 4 minutos es el más apropiado. No obstante, Sellappan *et al.* (2002), sugieren tiempos de medida de 6 minutos para los patrones de referencia y de 7 minutos para los compuestos puros, extractos de plantas o de alimentos.

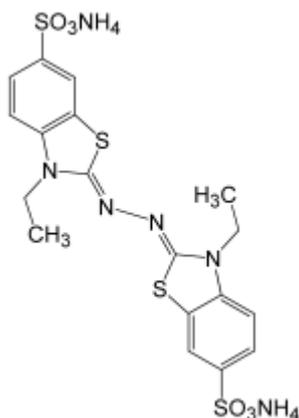


Figura 1.9.- Estructura de la sal amónica del ABTS.

Los resultados de este ensayo se suelen expresar en unidades TEAC (actividad antioxidante equivalente a Trolox) y en VCEAC (actividad antioxidante equivalente a vitamina C). Este último caso es el más habitual cuando se trata de análisis de alimentos. Conociendo el coeficiente de extinción del $ABTS^{++}$, también es posible

expresar el poder antioxidante como cantidad de ABTS^{•+} reducido por unidad de masa de muestra.

Entre los métodos utilizados para determinar la actividad de un antioxidante basados en la desactivación de radicales libres, el ensayo de decoloración del radical ABTS^{•+} es uno de los más aplicados, al considerarse un método de elevada sensibilidad, práctico, rápido y muy estable. A pesar de esto, como método de punto final que es, los valores de actividad antioxidante determinados pueden depender del tiempo escogido para efectuar la medida.

Atrapamiento de aniones superóxido

El radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) es una EAO que puede iniciar, entre otros, procesos de oxidación de lípidos de forma indirecta a través de la formación de radicales hidroxilo en presencia de metales de transición. Los ensayos para la medida de la capacidad desactivadora de $O_2^{\cdot-}$ se basan habitualmente en la inhibición de la reducción de un compuesto coloreado (normalmente una sal de tetrazolio, como el NBT) por el radical superóxido. En la medida en la que la concentración de compuestos antioxidantes en los medios de reacción aumenta, se produce una disminución de la cantidad de aceptor reducido y, por lo tanto, la reducción de color observada será menor. La cuantificación de estas variaciones de absorbancia a las longitudes de onda a las que absorben los cromóforos utilizados dará una indicación de la capacidad atrapadora de $O_2^{\cdot-}$ de la muestra ensayada.

Poder reductor/ antioxidante de hierro férrico

Benzie y Strain propusieron en 1996 un método para determinar la capacidad del plasma sanguíneo para reducir iones férricos (“Ferric Reducing Ability of Plasma”, FRAP). La aplicación de este método a la estimación de la capacidad antioxidante de todo tipo de muestras ha dado lugar a una redefinición de las siglas FRAP (por las que comúnmente se conoce este ensayo), pasando a denominarse también este ensayo como Poder reductor/antioxidante de hierro férrico (“Ferric-Reducing Antioxidant Power”).

El ensayo FRAP mide directamente la capacidad de los antioxidantes para reducir un complejo de Fe(III) con una tripiridiltriazina, la 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) (Figura 1.10), al correspondiente complejo de Fe(II) en medio ácido. El color azul resultante puede medirse espectrofotométricamente a 593 nm y se considera que está directamente relacionado con la capacidad reductora total de los antioxidantes dadores de electrones presentes en la muestra ensayada.

La utilización de este método se ha ido extendiendo por la facilidad en la obtención de los resultados, y se ha aplicado a muchos tipos de muestras biológicas. La principal desventaja de este método es que la capacidad reductora determinada no refleja necesariamente la actividad antioxidante total. Además, dado que el ensayo no incluye ningún sustrato oxidable, es imposible obtener información acerca de las propiedades protectoras de los antioxidantes. Por último, otro inconveniente radica en el precio del reactivo cromógeno, que puede limitar un tanto su utilización.

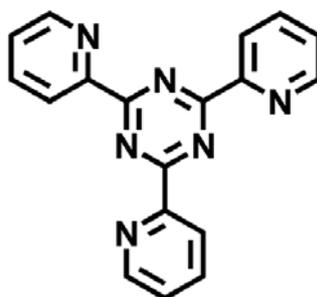


Figura 1.10.- Estructura de la 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ).

Determinación de la formación de dienos conjugados

La peroxidación de lípidos es uno de los principales procesos responsables del deterioro de la calidad de los alimentos. Por ello, numerosos esfuerzos han sido dedicados al desarrollo de métodos para detectar y cuantificar la peroxidación lipídica en sistemas modelos y en alimentos.

La determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), la determinación de la formación de peróxidos, la detección de compuestos volátiles y la determinación de valor de ácido, etc. representan la mayoría de los métodos usados en la medición de la peroxidación de lípidos. Todos estos ensayos pueden utilizarse para evaluar la capacidad antioxidante de una muestra, cuantificando la inhibición de los procesos en que se basan causada por la inclusión de esa muestra en los medios de reacción.

Sin embargo, en casi todos los ensayos mencionados lo que se miden son productos de oxidación secundarios, por lo que se obtiene muy poca información acerca de las etapas iniciales de los procesos de peroxidación lipídica.

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), son particularmente susceptibles a la abstracción de un átomo de hidrógeno en la posición adyacente (alílica) a un doble enlace (Figura 1.11). Debido a la estabilización por resonancia de las especies radicales intermediarias y al ataque electrofílico del oxígeno molecular, la reacción es normalmente acompañada de reordenamientos de los dobles enlaces, produciéndose la formación de un sistema de dienos conjugados de hidroperóxidos (Kim y Nawar, 1993).

Esta formación de dienos conjugados puede ser seguida de forma dinámica a través de las medidas de absorción a 234 nm, siempre y cuando otras especies absorbentes no interfieran. Las mediciones de hidroperóxidos y dienos conjugados, podrían ser utilizadas, por lo tanto, para medir el estadio temprano de la oxidación de lípidos. Actualmente, la primera de ellas es la más frecuentemente utilizada para tal fin.

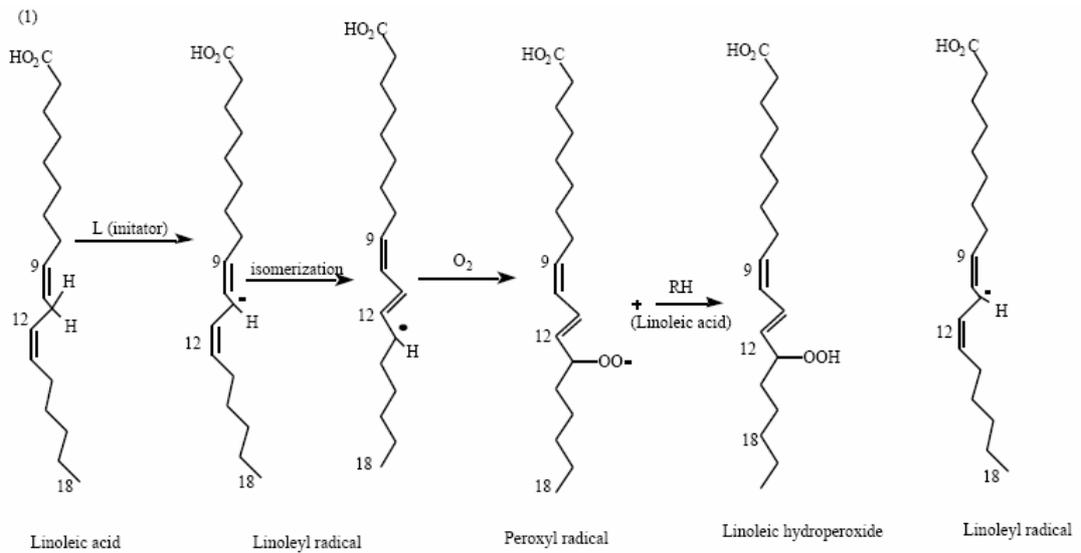


Figura 1.11.- Reacciones que conducen a la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados (ácido linoleico, en este ejemplo). Tomado de Vaya y Aviram, 2001.

Existen muchos más métodos para determinar diferentes aspectos de la actividad antioxidante de una muestra. Sin embargo, como regla general puede extraerse la conclusión de que no es adecuado utilizar un sólo ensayo para establecer el potencial antioxidante de un compuesto aislado o de una mezcla más o menos compleja de compuestos. Por otra parte, a la hora de predecir el comportamiento de un antioxidante en un alimento o en cualquier otro sistema (biológico o no) es necesario tener en cuenta, no sólo su poder antioxidante ensayado *in vitro* por uno o varios métodos, sino el conjunto de interacciones que pueden tener lugar entre el antioxidante y los componentes del sistema, ya que estas interacciones van a determinar las posibilidades de aplicación del producto.

1.2.- LAS PLANTAS AROMÁTICAS COMO FUENTE DE ANTIOXIDANTES NATURALES

En la búsqueda continua de fuentes de antioxidantes naturales con el fin de satisfacer las exigencias de los consumidores, se ha detectado en los últimos años un interés creciente por parte de la industria y de multitud de grupos de investigación en estudiar especies

vegetales pertenecientes a la familia botánica de las Labiadas (tomillo, romero, salvia, orégano, etc.), debido a sus potentes propiedades antioxidantes y antimicrobianas, que superan las de muchos de los antioxidantes naturales y sintéticos utilizados habitualmente.

En realidad, estas especies han sido utilizadas desde hace mucho tiempo como aditivos de diferentes alimentos para mejorar su sabor y prolongar su periodo de almacenamiento. Las especies aromáticas pueden ser añadidas a los alimentos de distintas formas, como planta entera, molidas o en forma de extracto. Debido a las propiedades aromatizantes y saborizantes de estas plantas, su uso directo como antioxidantes se ve muy limitado por la posibilidad de modificación de las propiedades organolépticas del producto sobre el que se aplican.

Por tanto, con vistas a la aplicación comercial como antioxidantes de las plantas aromáticas, resulta más adecuado utilizar extractos de las mismas. Una elección adecuada del método de extracción de los compuestos activos de la planta puede llevar a la mejora del rendimiento del proceso. El procedimiento de extracción, lógicamente, viene determinado en última instancia por el tipo de compuestos que queremos obtener. Así, los procesos de hidrodestilación están encaminados a la obtención de aceites esenciales, fuertemente aromáticos y enriquecidos en compuestos de naturaleza terpénica. Si lo que se pretende es obtener fracciones desodorizadas que conserven sus propiedades antioxidantes, se recurre, entre otros, a procesos de extracción por disolvente (etanol, metanol, acetona, hexano, etc.) para conseguir las denominadas oleorresinas. La polaridad del disolvente va a determinar en este caso la proporción entre los diferentes compuestos presentes en los extractos (Suhaj, 2006).

Las condiciones impuestas, en muchas ocasiones, para la extracción por los métodos comentados pueden dañar los compuestos antioxidantes que se pretenden aislar. Por tal motivo, han surgido una serie de técnicas de extracción que cumplen una doble misión: minimizan el deterioro de los compuestos de interés y se trata de tecnologías mínimamente contaminantes.

Entre estas tecnologías se encuentra la destilación molecular, la extracción con fluidos supercríticos, el uso de ultrasonidos, etc. (Nakatani et al., 1984; Muklopadhyay, 2000; Albu et al., 2004).

La operación de destilación molecular, también llamada destilación de camino corto, es una técnica de separación utilizada con frecuencia en la purificación de compuestos de baja volatilidad y termolábiles (Lanzani y Bondioli, 1994; Cvengros, 1995; Hernández y Rathbone, 1998; Ooi et al., 1994). Dadas las características termosensibles de algunos de los compuestos identificados como antioxidantes en muchas especies de labiadas, esta técnica se aplica para el fraccionamiento y concentración de los componentes de interés en extractos obtenidos utilizando procedimientos poco agresivos.

En cuanto a la utilización de los ultrasonidos, de forma gráfica se puede decir que los ultrasonidos "introducen una onda elástica en el medio donde se sitúa la muestra a extraer", Esa onda elástica genera en el medio una serie de "compresiones y descompresiones" que tiene como efectos "la microagitación y la cavitación", lo que conlleva cambios de presión, de temperatura y una agitación interna que acelera el proceso de extracción.

Otra tecnología ampliamente utilizada es la extracción con fluidos supercríticos, que tiene como principal ventaja el hecho de que no deja residuos indeseables en el producto final, a diferencia de lo que sucede con la extracción convencional por disolventes orgánicos (como el hexano) que conlleva un triple riesgo: para el consumidor, por la persistencia del disolvente, para los trabajadores que llevan a cabo el proceso, y para el medio ambiente.

Gran parte de la actividad antioxidante asociada a las plantas de la familia de las labiadas es debida a la presencia de compuestos fenólicos. Así, se conoce desde hace tiempo que el romero y la salvia, que pueden ser considerados como dos de los antioxidantes naturales más potentes que se conocen, contienen una mezcla de compuestos fenólicos simples (como el ácido rosmarínico y otros derivados del ácido cafeico) y de terpenos fenólicos (como el carnosol, el ácido carnósico, el rosmanol, etc.) que presentan un potente efecto antioxidante en multitud de ensayos realizados *in vitro*

(Figura 1.12). La presencia de estos mismos compuestos en otros integrantes de la familia de las labiadas (orégano, tomillo, albahaca, etc.) hace que estas especies, en general, presenten un gran interés desde un punto de vista de su utilización a escala industrial (Madsen y Bertelsen, 1995).

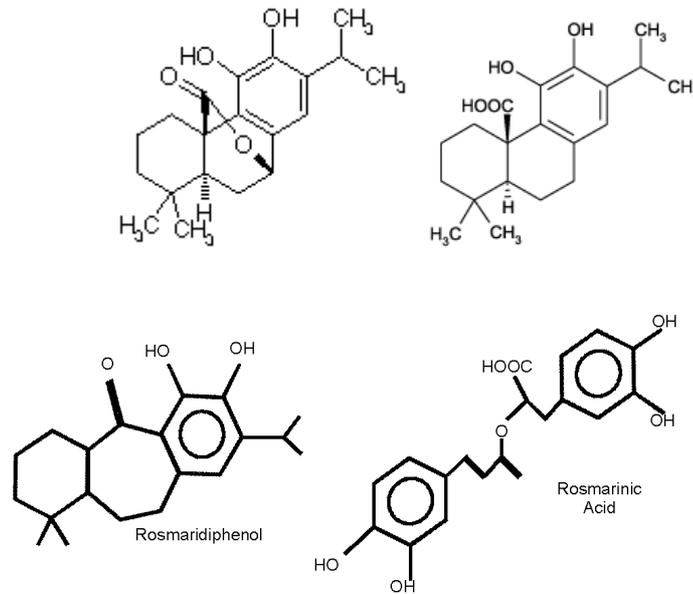


Figura 1.12.- Estructura de algunos compuestos fenólicos antioxidantes aislados de plantas aromáticas. Arriba, carnosol y ácido carnólico; abajo, rosmaridifenol y ácido rosmarínico

2.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

2.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

2.1.- EL TOMILLO COMO FUENTE DE ANTIOXIDANTES.

El tomillo pertenece taxonómicamente a la familia de las labiadas, género *Thymus* (etimológicamente del latín «Thymún» y del griego «Thymon») y a la clase de las Dicotiledóneas. El número de especies catalogadas actualmente supera las quinientas, aunque tal vez sean muchas más las existentes debido, entre otras cosas, a la gran facilidad que presenta esta planta aromática para producir hibridaciones y mutaciones.

Entre las especies más conocidas en nuestro país y que gozan de una mayor propagación y aprovechamiento se encuentran *Thymus zygis*, *T. hyemalis*, *T. vulgaris* (Figura 2.1), *T. mastichina*, *T. citriodotus*, *T. corydothymus*, *T. loscossi*, *T. pipirella*, *T. rumidicus hispánicos*, *T. communis*, etc.

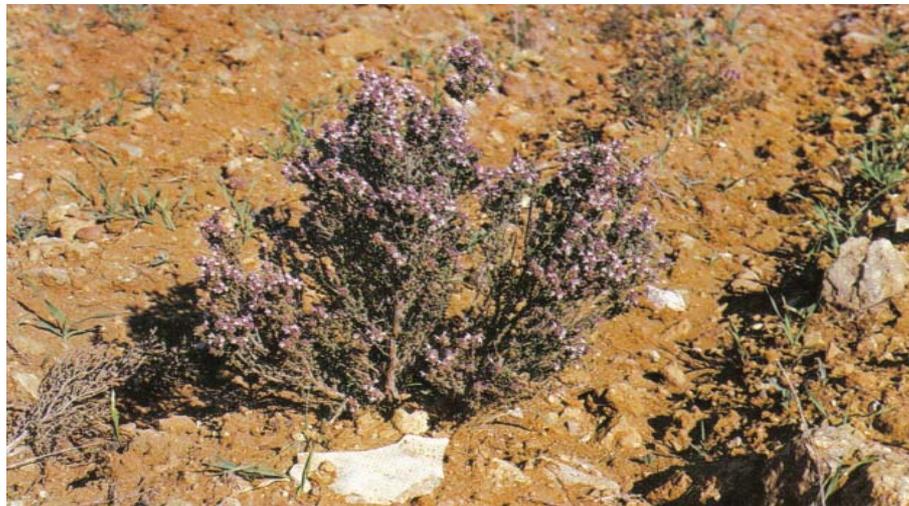


Figura 2.1.- Planta de *Thymus vulgaris*.

El principal aprovechamiento del tomillo en todas sus especies y variedades es el de sus hojas, destinadas a condimento y herboristería. Otro aprovechamiento importante que afecta principalmente a las especies *T. zygis*, *T. mastichina*, *T. corydothymus* y a alguna otra más, es la obtención de aceites esenciales mediante el proceso de destilado.

Entre los componentes fenólicos del aceite de tomillo se encuentran el timol y el carvacrol, que es un isómero del anterior. El timol proporciona al aceite de tomillo sus peculiaridades olfativas. Según el lugar de procedencia y la especie de tomillo, dicho aceite ofrece unos porcentajes de riqueza fenólica que oscilan del 40 al 80 por 100 de timol y hasta un 55 por 100 de carvacrol.

La esencia de tomillo tiene múltiples aplicaciones, tanto en medicina como en perfumería. De la esencia de tomillo se extraen sustancias balsámicas, vermícidas y bactericidas de empleo muy diverso.

Entre los compuestos antioxidantes identificados en diferentes especies del género *Thymus* se encuentran los siguientes:

- | | | |
|------------------|-------------------------|--------------------------|
| -4- Terpeneol. | - Ác. Clorogénico | - Isotimonina. |
| - Alanina. | - Crisoeriol. | - Canferol. |
| - Anetol. | - Eriodictidol. | - Ác. Labiático. |
| - Apigenina. | - Eugenol. | - Ác. Láurico. |
| - Ác. Ascórbico. | - Ác. Ferúlico. | - Acetato de Lilalilo. |
| - Betacaroteno. | - Ác. Gálico. | - Luteolina. |
| - Ác Cafeico. | - α – Terpineno. | - Metionina. |
| - Canfeno. | - Ác. Isoclorogénico. | - Mirceno. |
| - Carvacrol. | - Isoeugenol. | - Ác. p-hidroxibenzoico. |
| - Ác Palmítico | - Ác. Rosmarínico. | - Selenio. |
| - Tanino. | - Timol. | - Triptófano. |
| - Ác. Ursólico. | - Ác Vainíllico. | |

Otros componentes encontrados en los aceites esenciales serían el cimeno, linalool, borneol y sus ésteres acéticos, cineol, geraniol, y cariofiteno.

En conjunto las especies del género *Thymus* presentan un elevado interés como especies aromático-medicinal-condimentarias, siendo recolectadas en la naturaleza a mayor o menor escala. La mayor parte de los tomillos se recolecta por arranque, lo que origina frecuentemente una disminución de las poblaciones, el deterioro del suelo y de las comunidades donde viven, algunas de elevado interés botánico. Este hecho, junto con la

variabilidad presente en las poblaciones naturales, que botánicamente es muy deseable, juegan en contra de la homogeneidad necesaria para la explotación comercial de estas y otras plantas aromáticas y medicinales, que deberían conseguir, al igual que el resto de productos agroalimentarios, un estándar de producción, reproducible en el tiempo en cuanto a cantidad y calidad.

Sería deseable, por lo tanto, encontrar métodos de producción alternativos que permitieran respetar las poblaciones naturales de la planta al mismo tiempo que proporcionen un suministro estable (cualitativa- y cuantitativamente) de los compuestos de interés presentes en estas especies.

La utilización de técnicas de cultivo *in vitro* abre la posibilidad de disponer de una cantidad ilimitada de material vegetal en un espacio relativamente pequeño. Como ventaja adicional derivada de esta metodología, cabe destacarse la uniformidad genética del material obtenido, lo que garantiza, en igualdad de condiciones ambientales, la homogeneidad en la producción de biomasa y de metabolitos secundarios.

El cultivo *in vitro* de algunas especies de tomillo no es algo infrecuente, como no lo es la utilización, al menos a nivel de laboratorio, de los clones obtenidos para la producción de compuestos bioactivos (Kwok y Shetty, 1998). Como regla general, el material vegetal introducido en cultivo *in vitro* suele presentar unos niveles de acumulación de metabolitos secundarios menores que los de la planta de la que procede. Para aumentar la producción de este tipo de compuestos se han venido aplicando una serie de técnicas que han dado como resultado la obtención de líneas superproductoras, adecuadas para la explotación comercial del proceso.

Una de esas técnicas es la elicitación, consistente en el tratamiento del material cultivado *in vitro* con determinados compuestos químicos que activan las rutas biosintéticas que conducen a la acumulación de un metabolito (o grupo de metabolitos) determinado. Estos compuestos bioactivadores suelen desencadenar la expresión de algunos de los componentes de la respuesta defensiva de las plantas y dado que, en general, los metabolitos de interés suelen estar asociados a este tipo de respuestas fisiológicas (reciben por ello el nombre de metabolitos de estrés), el resultado final de los tratamientos podría ser un aumento de la producción del compuesto de interés.

Como agentes bioactivadores se han empleado una gran variedad de compuestos aislados, mezclas complejas de origen biótico y tratamientos abióticos. En *Thymus vulgaris*, por ejemplo, el tratamiento de cultivos de vástagos con prolina y análogos de prolina condujo a un aumento en la producción de compuestos fenólicos, entre los cuales se encontraba el ácido rosmarínico (Kwok y Shetty, 1998). Ácido jasmónico, ácido salicílico, elicitores de origen fúngico y bacteriano, etc. han sido aplicados a diferentes sistemas de cultivo *in vitro* (cultivos celulares, de raíces transformadas, etc.) de labiadas (albahaca, cóleo, etc.), describiéndose aumentos significativos en la producción de compuestos antioxidantes (Bais *et al.*, 2002; Szabo *et al.*, 1999).

2.2.- EFECTO DEL ÁCIDO SALICÍLICO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ANTIOXIDANTES.

La inducción de las respuestas defensivas de las plantas, por lo tanto, puede constituir una estrategia productiva de enorme interés. Uno de los compuestos que en los últimos años ha sido objeto de un mayor número de estudios es el ácido salicílico (SA) (Figura 2.2).



Figura 2.2.- Estructura química del ácido salicílico.

El SA es un compuesto que presenta cierta actividad antioxidante por sí mismo. Investigadores del CSIC han desarrollado un procedimiento, denominado “activación

molecular”, que permite mejorar considerablemente la actividad biológica y la reactividad bioquímica de las moléculas antioxidantes, especialmente de aquéllas que contienen grupos carboxilo en su estructura. Este proceso de activación molecular consiste en someter a las moléculas tratadas a un determinado campo eléctrico, durante un tiempo calculado previamente y con unas condiciones específicas para cada tipo de molécula, estudiando previamente los parámetros físico-químicos más adecuados para cada caso. Entre los factores químicos más importantes que afectan al proceso de activación están la estructura molecular, los grupos funcionales activos, catalizadores antioxidantes específicos, el peso molecular, el pH, los dobles enlaces de carbono, su coeficiente de solubilidad, etc., así como la capacidad antioxidante de cada molécula. El efecto de la activación molecular sobre la capacidad antioxidante del ácido salicílico se muestra en la Figura 2.3.

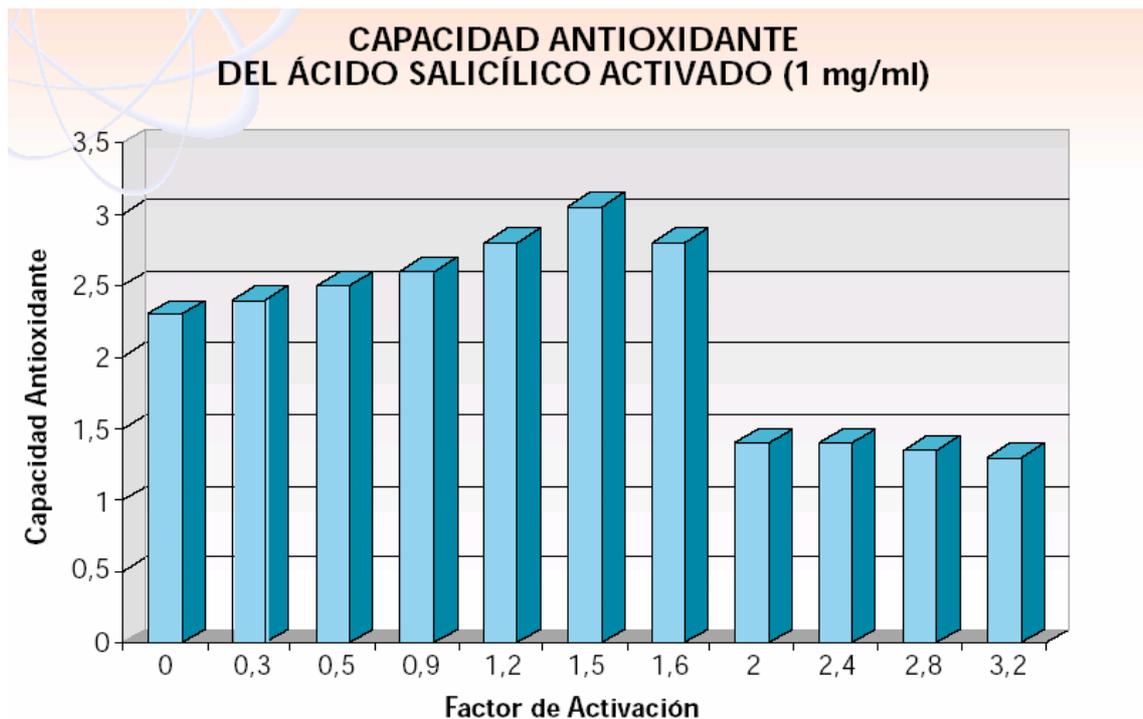


Figura 2.3.- Efecto de la intensidad del proceso de activación molecular sobre la capacidad antioxidante del ácido salicílico.

Aparte de este efecto antioxidante directo del SA, este compuesto puede estimular la producción de compuestos antioxidantes en materiales vegetales de una forma indirecta. Así, está ampliamente reconocido que el SA desempeña un papel esencial en la

inducción de la resistencia sistémica adquirida (Dempsey *et al.*, 1999; Durrant y Dong, 2004; Yang *et al.*, 2004) y en las respuestas defensivas de las plantas a diversos agentes abióticos, como daños por frío (Janda *et al.*, 1999), luz UV (Yalpani *et al.*, 1994) y ozono (Sharma *et al.*, 1996). La interacción entre el SA y el H₂O₂ está bien documentada y ambas moléculas podrían actuar de forma conjunta en la aclimatación a las situaciones de estrés biótico y abiótico (Breusegem *et al.*, 2001). Se ha sugerido que el SA podría actuar inhibiendo la actividad de la catalasa y de la ascorbato peroxidasa, que son las principales enzimas implicadas en la eliminación del H₂O₂ en plantas. Esta inhibición podría generar un aumento local de los niveles de H₂O₂ ("microburst") que permitiría intensificar y dispersar las señales requeridas para el establecimiento de las respuestas adaptativas de las plantas (Rao *et al.*, 1997). Todo ello sin perjuicio de que puedan existir otros modos de actuación, como la activación de la enzima fenilalanina-amonio liasa (PAL), lo que conduciría a la síntesis de compuestos fenólicos (Wen *et al.*, 2005); o a cambios en el patrón de isoenzimas de algunas proteínas (Lajara *et al.*, 2003; Minibayeba *et al.*, 2003) que afectarían a la acumulación de metabolitos secundarios al activar los procesos biosintéticos o inhibir el catabolismo de este tipo de compuestos.

2.3.- OBJETIVOS.

Teniendo en cuenta lo expuesto en los apartados anteriores, este Proyecto se plantea con el objetivo principal de evaluar la capacidad antioxidante de extractos procedentes de plantas de una especie de tomillo, *Thymus membranaceus* (Figura 2.4), cultivadas *in vitro*.



Figura 2.4.- Detalle de las inflorescencias de *Thymus membranaceus*. (Fotografía cedida por los Dres. Francisco Alcaraz y José Álvarez).

La elección de esta especie se justifica por tratarse de un endemismo botánico del sudeste peninsular que está catalogada como “especie cuyo aprovechamiento puede ser objeto de medidas de gestión” en el Libro Rojo de la flora silvestre protegida de la Región de Murcia y sobre la cual, exceptuando algunos trabajos de la década de los ochenta (Ferrerres *et al.*, 1985; Tomás *et al.*, 1985), apenas existe información sobre su composición química y actividad biológica.

Para alcanzar el objetivo mencionado, se plantean como objetivos parciales del Proyecto los siguientes:

- 1.- Estudiar el efecto de disolventes de diferente polaridad sobre la extracción de compuestos antioxidantes de vástagos de *T. membranaceus* cultivados *in vitro*.
- 2.- Evaluar el efecto del ácido salicílico sobre la producción de antioxidantes en cultivos *in vitro* de vástagos de *T. membranaceus*.
- 3.- Identificar algunos de los compuestos antioxidantes presentes en los extractos obtenidos de los vástagos de *T. membranaceus* cultivados *in vitro*.

La capacidad antioxidante de los extractos del material vegetal se evaluará utilizando diferentes ensayos, con el fin de intentar conseguir una caracterización más completa de dicha capacidad.

3.- MATERIALES Y MÉTODOS.

3.- MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1.- CULTIVO *IN VITRO* DE LAS PLANTAS DE TOMILLO.

Como material de trabajo se utilizaron plantas de *Thymus membranaceus* cultivadas *in vitro* (Figura 3.1). La multiplicación de este material se llevó a cabo siguiendo un protocolo de propagación por segmentos nodales, empleando la combinación de macro- y micronutrientes descrita por Driver y Kuniyuki (1984). Además de las sales, los medios de cultivo se complementaron con hidrolizado de caseína (250 mg/l), sacarosa (30 g/l) y las vitaminas descritas por Murashige y Skoog (1962). El pH de los medios se ajustó a 6.0 y para la gelificación de los medios se empleó agar a una concentración de 8 g/l (Tabla 3.I).



Figura 3.1.- Plantas de *Thymus membranaceus* cultivadas *in vitro* después de 6 semanas desde su subcultivo.

Tabla 3.I Composición del medio de cultivo utilizado en los ensayos.

MICRONUTRIENTES	CONCENTRACIÓN (mg/l)
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.25
FeNaEDTA	44.63
H ₃ BO ₃	4.80
MnSO ₄ .H ₂ O	33.80
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.39
ZnNO ₃ .6H ₂ O	17.00
MACRONUTRIENTES	
CaCl ₂	112.50
Ca(NO ₃) ₂	1367.00
KH ₂ PO ₄	265.00
K ₂ SO ₄	1559.00
MgSO ₄	361.49
NH ₄ NO ₃	1416.00
VITAMINAS	
GLICINA	2.00
MIO-INOSITOL	100.00
ACIDO NICOTINICO	0.50
PIRIDOXINA HCl	0.50
TIAMINA HCl	0.10
OTROS COMPONENTES	
HIDROLIZADO DE CASEÍNA	250.00
SACAROSA	30000.00

Los segmentos nodales aislados se introdujeron en frascos de cultivo que contenían 100 ml del medio descrito a razón de 4 ó 5 explantes por frasco. Una vez realizado el subcultivo, los frascos se mantuvieron bajo un fotoperiodo de 14/10 horas (luz/oscuridad), a una intensidad luminosa de $75 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y a 25 °C. Para el mantenimiento de las líneas, el material vegetal se subcultivó a intervalos de tiempo de 6-8 semanas. La toma de muestras para llevar a cabo los análisis descritos en apartados posteriores se realizó con cultivos de 5 meses, en el caso de los ensayos preliminares de extracción de antioxidantes, y de 8 semanas, en los tratamientos con ácido salicílico.

3.2.- TRATAMIENTOS CON ÁCIDO SALICÍLICO.

Para llevar a cabo los tratamientos con ácido salicílico, segmentos nodales de plantas crecidas *in vitro* fueron transferidos a medios de cultivo que contenían este compuesto a diferentes concentraciones: 0.00; 0.01; 0.10 y 1.00 mM.

Para evitar posibles reacciones indeseables, el ácido salicílico se esterilizó por filtración, pasando disoluciones hidroalcohólicas del compuesto (etanol:agua, 50:50 v/v) a través de filtros de 0.22 μm , y se añadió a los medios de cultivo esterilizados por autoclave el volumen correspondiente para dar la concentración deseada. La concentración final de etanol en todos los tratamientos (incluido el control) fue del 0.2 % (v/v).

En cada ensayo se dispusieron un total de 20 frascos de cultivo (5 por cada una de las concentraciones) que contenían entre 4 y 6 segmentos nodales por frasco. Una vez subcultivados, los segmentos nodales se mantuvieron en las condiciones de luz y temperatura descritas en el apartado anterior durante 8 semanas. Transcurrido este tiempo se procedió según lo descrito en los apartados siguientes.

3.3.- OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS A PARTIR DE LAS PLANTAS CULTIVADAS *IN VITRO*.

Para la obtención de los extractos utilizados para llevar a cabo los ensayos descritos en esta Memoria, se utilizaron vástagos procedentes de plantas crecidas en las condiciones indicadas anteriormente. Los vástagos, inmediatamente después de ser aislados, se introdujeron en nitrógeno líquido y se trituraron con ayuda de un mortero, cuidando de mantener baja la temperatura mediante adiciones constantes de nitrógeno líquido. Una vez triturado, el polvo obtenido se almacenó a -80C° hasta el momento de su utilización.

Para llevar a cabo las extracciones se pesaron alrededor de 250 mg de polvo a los que se les añadieron 2 ml del agente extractante. Las extracciones se llevaron a cabo con tres disolventes de diferente polaridad: agua, metanol y hexano. En todos los casos, la

extracción se realizó utilizando viales de centelleo que se mantuvieron en agitación constante, en oscuridad y a temperatura ambiente, durante 1 hora. Transcurrido este tiempo los medios de extracción se centrifugaron a $12000 \times g_{\max}$ durante 5 minutos y a 4°C . Los sobrenadantes así obtenidos fueron inmediatamente almacenados a -80°C hasta su utilización en los análisis correspondientes.

En el caso del material procedente de los tratamientos con ácido salicílico, la extracción se llevó a cabo sólo utilizando metanol como disolvente.

Ocasionalmente, los extractos metanólicos fueron parcialmente purificados y concentrados utilizando cartuchos Sep-Pak C18 (Waters) preacondicionados con metanol y agua, según las instrucciones del fabricante. Los extractos se diluyeron con agua desionizada de calidad MilliQ hasta conseguir que la concentración de metanol no sobrepasase el 3% y se cargaron en las columnas. Una vez cargada la muestra, se lavó el cartucho con agua MilliQ y los componentes retenidos se eluyeron con 1 ml de metanol. Los extractos parcialmente purificados se conservaron a -80°C hasta su posterior análisis.

3.4.- DETERMINACIÓN DE CLOROFILAS Y CAROTENOIDES.

La determinación de clorofilas a y b, así como la determinación de carotenoides totales, se llevó a cabo utilizando los extractos metanólicos y aplicando las ecuaciones propuestas por Lichtenthaler y Wellburn (1983):

$$C_a = 15.65 A_{666} - 7.34 A_{653}$$

$$C_b = 27.05 A_{653} - 11.21 A_{666}$$

$$C_{x+c} = (1000 A_{470} - 2.86 C_a - 129.2 C_b) / 245$$

donde C_a , C_b y C_{x+c} representan las concentraciones de clorofila a, clorofila b y carotenoides totales (xantofilas + carotenos), respectivamente, expresadas en μg por ml de extracto. Estos valores fueron transformados para expresar finalmente los resultados en μg de clorofila o carotenoides por g de peso fresco de vástago.

3.5.- DETERMINACIÓN DE LOS FENOLES SOLUBLES TOTALES.

La determinación de los fenoles solubles totales se llevó a cabo según el método de Marigo (1973). Para ello , a 100 µl de extracto se le añadieron 150 µl del reactivo Folin-Ciocalteu (diluido 1:1 en agua MilliQ), y 1 ml de una disolución de Na₂CO₃ al 2 % y NaOH al 0.4 %.

Después de 20 minutos de incubación a 25 °C, en la oscuridad, se midió la absorbancia a 750 nm de los medios de reacción. Las medidas fueron realizadas, al menos, por duplicado y frente a un blanco con agua, metanol o hexano, de acuerdo con la naturaleza del extracto.

La recta de calibrado para la estimación de las concentraciones de compuestos fenólicos se realizó utilizando ácido cafeico disuelto en metanol, empleando un rango de concentraciones comprendidas entre 0-1000 µM.

3.6.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

A continuación se describen las diferentes metodologías utilizadas para la determinación de la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos de las plantas de tomillo.

3.6.1.- CAPACIDAD ATRAPADORA DEL RADICAL DPPH[•].

La determinación del poder antioxidante de los extractos, estimada a través de su capacidad para desactivar radicales libres, se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Brand-Williams *et al.* (1995), con algunas modificaciones. Para ello, a 50 µl de los extractos, obtenidos según lo descrito anteriormente y convenientemente diluidos, se les añadió 1 ml de una disolución metanólica del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo

(DPPH), dejando incubar 30 minutos la mezcla en la oscuridad y a una temperatura de 25 °C. Transcurrido este tiempo, se midió la absorbancia de los medios de reacción a 517 nm y este valor se comparó con un blanco compuesto por 50 µl de metanol, agua o hexano (dependiendo de la naturaleza del extracto ensayado) y 1 ml de DPPH.

La cuantificación de la actividad atrapadora de DPPH se llevó a cabo por sustracción de los valores de absorbancia a 517 nm del blanco y de las muestras, considerando el descenso de absorbancia debido a la reducción del radical DPPH. Los resultados finales se expresan como µmol de DDPH reducido por gramo de peso fresco de vástago, utilizando para ello un coeficiente de extinción molar para el DPPH reducido de 12500 M⁻¹ cm⁻¹ (Brand Williams *et al.*, 1995).

3.6.2.- ENSAYO DE DECOLORACIÓN DEL CATION RADICAL ABTS.

Este método está basado en la capacidad de los extractos para desactivar el catión radical del ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS^{•+}). En la presente Memoria se utilizaron dos procedimientos para generar el citado catión radical. Por una parte se utilizó el método descrito por Alcolea *et al.* (2002) basado en la utilización de un sistema peroxidasa de rábano (HRP)/H₂O₂ para oxidar al ABTS. Los medios de reacción estaban compuestos por ABTS 2 mM, H₂O₂ 30 µM y HRP 0.25 µM en tampón fosfato 50 mM, pH 7.5. El progreso de la reacción de oxidación se siguió midiendo la absorbancia a 734 nm y, una vez estabilizada la absorbancia, se añadió el extracto a ensayar, registrándose la caída de absorbancia a esa longitud de onda hasta absorbancia constante.

El segundo método utilizado para la generación del catión radical del ABTS está basado en el descrito por Siddhuraju y Becker (2007). Una disolución acuosa de ABTS 7 mM se incubó en presencia de persulfato potásico 2.45 mM durante 16 horas, a 25 °C y en la oscuridad. Antes de llevar a cabo el ensayo con los extractos procedentes de las plantas tratadas con ácido salicílico, la disolución conteniendo el catión radical del ABTS se diluyó con etanol hasta conseguir una absorbancia a 734 nm de 0.700. A 950 µl de esta disolución se le añadió un volumen apropiado de extracto (10 ó 25 µl) y la mezcla se

incubó durante 30 minutos en la oscuridad y a 25 °C. Transcurrido este tiempo se midió la absorbancia a 734 nm de los medios de reacción, comparándose con la de un blanco con metanol.

Los resultados finales se expresaron como μmol de $\text{ABTS}^{\cdot+}$ reducido por g de peso fresco de vástago, utilizando un coeficiente de extinción molar a 734 nm para el $\text{ABTS}^{\cdot+}$ de $15000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Re *et al.*, 1999).

3.6.3.- DETERMINACIÓN DEL PODER REDUCTOR.

El poder reductor de los extractos se determinó según el método descrito por Oyaizu (1986) con pequeñas variaciones. A 200 μl de extracto convenientemente diluido se le añadieron 0.5 ml de tampón fosfato 0.2 M, pH 6.6, y 0.5 ml de ferricianuro potásico al 1%. Esta mezcla se incubó a 50°C durante 20 minutos, añadiéndole posteriormente 0.5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10 % (p/v) en agua. A continuación, esta mezcla se centrifugó a $1086 \times g_{\text{max}}$ durante 10 minutos y, posteriormente, a 0.5 ml del sobrenadante obtenido se le añadieron 0.5 ml de agua destilada y 0.1 ml de cloruro férrico al 0.1 %, registrándose la absorbancia de la mezcla a 700 nm.

El poder reductor se expresó en μmol equivalentes de ácido ascórbico por g de peso fresco de vástago, para lo cual se construyó la correspondiente recta patrón.

3.6.4.- DETERMINACIÓN DEL PODER REDUCTOR/ANTIOXIDANTE FÉRRICO (FRAP).

Este método, desarrollado inicialmente para medir la capacidad antioxidante en muestras de plasma (Benzie y Strain, 1996), se emplea para disponer de una medida simple y directa de la capacidad reductora/antioxidante de extractos vegetales. El ensayo FRAP mide el cambio de absorbancia a 593 nm debido a la formación de un complejo Fe(II)-tripiridiltriazina de color azul a partir de una sal incolora de Fe(III).

El ensayo se realizó según lo descrito por Katalinic et al. (2004). Para ello se preparó una disolución de trabajo de reactivo compuesta por la mezcla de 10 volúmenes de tampón fosfato 0.25 M, pH 3.6, 1 volumen de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) 10 mM en HCl 40 mM y 1 volumen de cloruro férrico 20 mM. A 1.5 ml de esta mezcla se le añadieron 50 µl de extracto convenientemente diluido y 150 µl de agua MilliQ. Los medios de reacción se incubaron durante 30 minutos a 37°C y, una vez transcurrido este tiempo, se registró la absorbancia a 593 nm.

Los resultados se expresaron como µmol de Fe(II) por g de peso fresco de vástago. Para ello se construyó una recta patrón con disoluciones de concentración conocida de FeSO₄, comprendidas entre 0.2 y 10 mM.

3.6.5.- MÉTODO DE LOS DIENOS CONJUGADOS.

La medida de la actividad antioxidante de los extractos basada en la determinación de la formación de dienos conjugados se llevó a cabo según lo descrito por Lingnert et al. (1979), con algunas variaciones. A 1 ml de una disolución de ácido linoleico 10 mM en tampón fosfato 0.2 M, pH 6.5, conteniendo triton X-100 al 1 % (p/v), se le añadieron 100 µl de extracto (o de agua, metanol o hexano, dependiendo de la naturaleza del extracto) y la mezcla se incubó a 37 °C durante 15 horas, en la oscuridad. Transcurrido este tiempo, los medios de reacción se diluyeron con metanol al 60 % (factor de dilución 96) y se registró la absorbancia a 234 nm.

Los resultados finales se expresaron como la diferencia entre los µmoles de dienos conjugados formados en los blancos menos los µmoles de dienos conjugados formados en los medios de reacción que contenían los extractos. Para el cálculo de los µmoles de dienos conjugados formados se usó un coeficiente de extinción molar de 25000 M⁻¹cm⁻¹ (Sicilia *et al.* 2005).

3.7. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS INDIVIDUALES MEDIANTE HPLC

Todos los análisis fueron llevados a cabo con un sistema Waters (Millipore Corp., Waters Chromatography) modelo Alliance 2695, compuesto por un módulo de separación modelo 2695, una bomba cuaternaria, un inyector automático y un detector de fotodiodo modelo 2996. Los datos fueron procesados con el programa informático Waters Millennium³².

Para la cromatografía en fase reversa se empleó una columna LiChrocart RD C-18 (Merck) de 4 mm de diámetro interno x 250 mm de longitud y 5 µm de tamaño de partícula. Las separaciones se realizaron a temperatura ambiente tal y como se describen en Proestos *et al.*, 2005. La fase móvil consistió en ácido acético al 1 % en agua (disolvente A), ácido acético al 6 % en agua (disolvente B) y una mezcla agua:acetonitrilo (65:30, v/v) en ácido acético al 5 % (disolvente C). El gradiente utilizado fue el siguiente: 100 % A, 0-10 minutos; 100 % B, 10-30 minutos; 90 % B/10 % C, 30-50 minutos; 80 % B/20 % C, 50-60 minutos; 70 % B/30 % C, 60-70 minutos; 100 % C, 70-105 minutos; 100 % A, 105-120 minutos. La velocidad de flujo se fijó en 0.5 ml/minuto y el volumen de inyección fue de 20 µl.

Los extractos procedentes de los tratamientos con ácido salicílico también fueron analizados después de ser sometidos a un proceso de hidrólisis química empleando HCl 1.2 M. Las muestras se incubaron durante 15 horas con agitación continua y en la oscuridad. Antes de su análisis todas las muestras se filtraron a través de un filtro de 0.45 µm.

La identificación de compuestos fenólicos individuales se llevó a cabo por comparación de las propiedades espectrales y tiempos de retención de los picos mayoritarios de las muestras con esas mismas características en los siguientes compuestos estándar: ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido rosmarínico, ácido salicílico y (+)-catequina (Figura 3.2).

La cuantificación del ácido cafeico y del ácido rosmarínico presentes en los extractos nativos e hidrolizados se llevó a cabo inyectando diferentes concentraciones (5-1000 μM) de los estándares correspondientes puros y construyendo una recta patrón teniendo en cuenta las áreas de los picos aparecidos en los cromatogramas obtenidos a 325 nm, en el caso del ácido cafeico, y a 330 nm, en el caso del ácido rosmarínico.

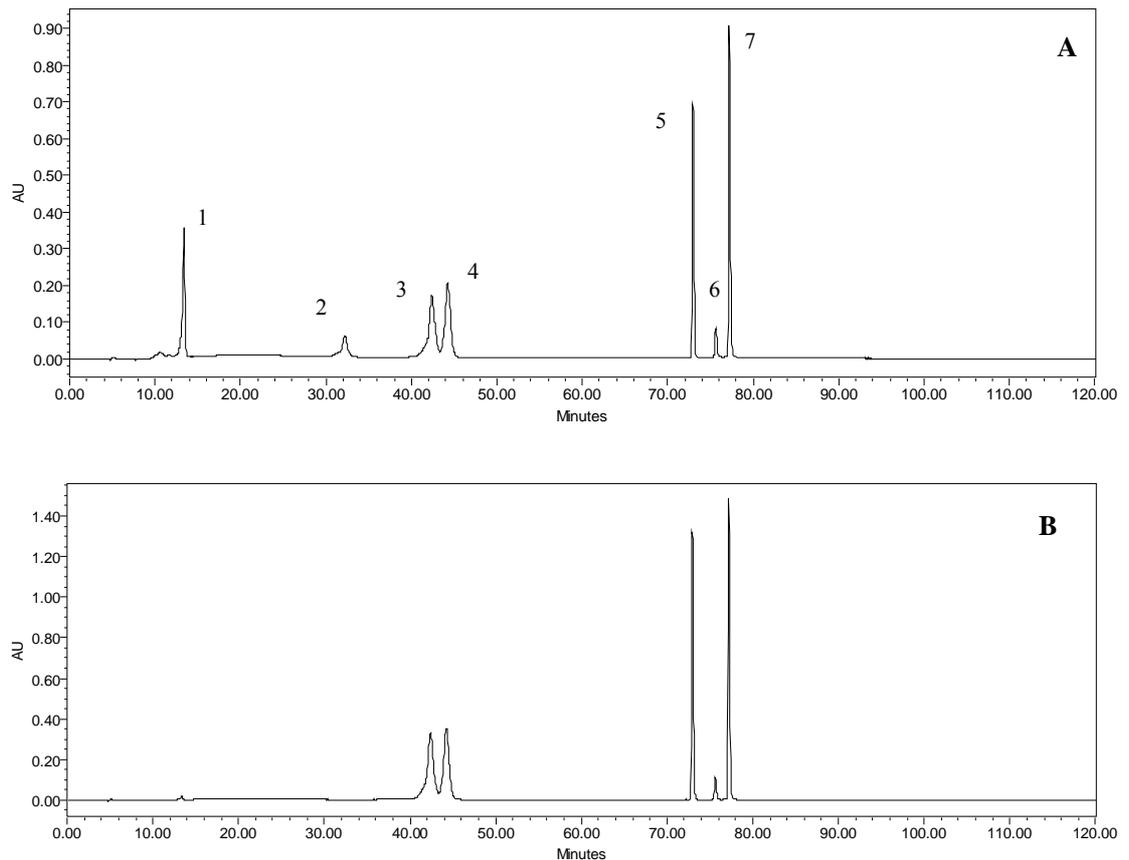


Figura 3.2.- Cromatogramas a 280 nm (A) y a 320 nm (B) de una mezcla de estándares utilizados para la identificación de los compuestos presentes en los extractos. 1, ácido gálico; 2, catequina; 3, ácido clorogénico; 4, ácido cafeico; 5, ácido ferúlico; 6, ácido salicílico; 7, ácido rosmarínico.

3.8. TRATAMIENTO DE LOS DATOS

Todos los valores representados corresponden a los valores medios \pm el error estándar de las repeticiones realizadas para cada uno de los ensayos llevados a cabo. Mientras no se indique lo contrario, todas las determinaciones se llevaron a cabo, al menos, por duplicado.

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En este capítulo del proyecto se mostrarán los resultados obtenidos después de realizar los análisis descritos en el apartado anterior. En un primer apartado se mostrarán los ensayos preliminares realizados con plantas de 5 meses y que tenían como finalidad comprobar la idoneidad de 3 métodos de extracción sobre la recuperación de los compuestos antioxidantes presentes en el material vegetal.

Seguidamente se presentarán los resultados obtenidos cuando las plantas fueron tratadas *in vitro* con concentraciones crecientes de ácido salicílico durante un periodo de 2 meses.

4.1.- EFECTO DE DIFERENTES DISOLVENTES SOBRE LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES EN PLANTAS DE *Thymus membranaceus* CULTIVADAS IN VITRO.

4.1.1.- CONTENIDO EN CLOROFILAS, CAROTENOIDES Y COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN LOS EXTRACTOS.

En la Tabla 4.I se muestra el contenido en clorofilas a y b, carotenoides totales y las relaciones entre estos parámetros presentes en los extractos fenólicos obtenidos a partir de vástagos de plantas de *T. membranaceus* cultivadas durante 5 meses *in vitro*. La elección de este, aparentemente, largo periodo de tiempo de subcultivo tiene un doble objetivo. Por un lado, a tiempos largos priman los fenómenos de diferenciación sobre los de crecimiento en el material vegetal, por lo que, en el caso de contar con una línea de cultivo productora de metabolitos secundarios, se podrían esperar mayores niveles de acumulación que para un cultivo menos prolongado.

Por otra parte, un largo periodo de cultivo en el mismo frasco suele inducir una situación de estrés en el material cultivado. Este estrés puede ser debido a diferentes

motivos, como la escasez de nutrientes o la acumulación de compuestos nocivos en el medio o en la cámara aérea del frasco de cultivo. Normalmente, estas situaciones de estrés tienen como consecuencia la producción de compuestos defensivos, muchos de ellos con propiedades antioxidantes, en los materiales cultivados (López Arnaldos et al., 2001).

Tabla 4.I.- Contenidos en clorofilas y carotenoides (expresados en μg de compuesto por g de peso fresco de vástago) en extractos metanólicos procedentes de vástagos de *T. membranaceus* cultivados in vitro durante 5 meses. Cl_{Tot} , clorofilas totales; $\text{C}_{\text{x+c}}$, carotenoides totales (xantofilas más carotenos).

	Cl_a	Cl_b	Cl_{Tot}	Cl_a/Cl_b	C_{x+c}	Cl_{Tot}/C_{x+c}
Extracto metanólico	150.71	97.34	248.05	1.55	12.63	19.64

Los niveles de clorofilas y carotenoides totales determinados en las muestras son relativamente bajos, probablemente por haber sido incubadas las plantas en condiciones de baja intensidad luminosa y/o por haberse iniciado los procesos de senescencia foliar. La relación clorofila a/clorofila b también es relativamente baja y propia de plantas de sombra. En cuanto a la relación clorofila total/carotenoides es relativamente alta, indicando, por una parte, las características de plantas de sombra del material estudiado, y, por otra parte, una baja capacidad de este material vegetal para adaptarse a condiciones ambientales que provoquen una situación de estrés oxidativo en los cloroplastos, debido a los bajos niveles relativos de antioxidantes de naturaleza carotenoide.

En cuanto a los niveles de compuestos fenólicos solubles extraídos con agua, metanol y hexano, los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.2. En dicha figura se observa una mayor recuperación de este tipo de compuestos al emplear metanol como disolvente, siendo del orden de un 50 % superior con respecto a la extracción con agua y unas 50 veces mayor que la extracción de fenoles solubles conseguida con el hexano.

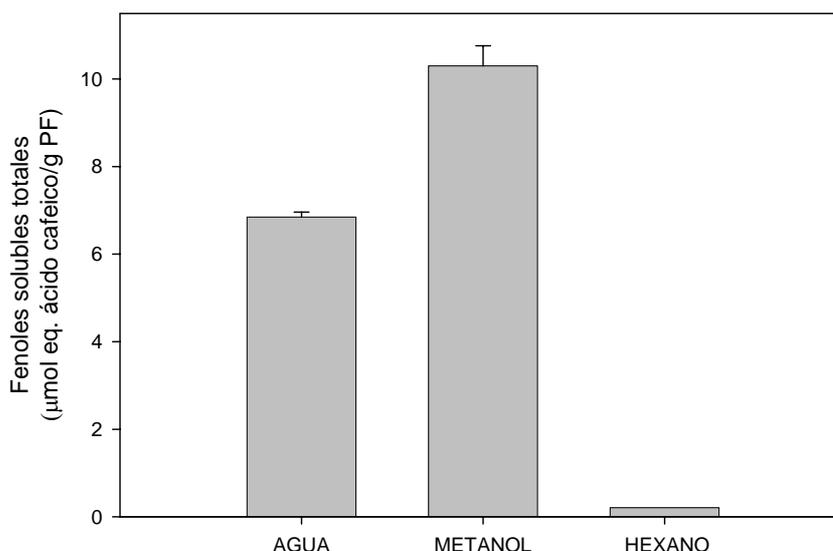


Figura 4.1.- Contenido en fenoles solubles totales extraídos de vástagos de *T. membranaceus* cultivados durante 5 meses empleando diferentes disolventes. Las barras representan el error estándar de las determinaciones.

Los datos mostrados en la Figura 4.1 son, hasta cierto punto, previsibles, ya que la polaridad intermedia del metanol permite la extracción de compuestos que reúnen ciertas características hidrofóbicas (anillos aromáticos, cadenas laterales de hidrocarburos, etc.) con grupos funcionales y sustituyentes polares (grupos hidroxilo y carboxilo, azúcares, etc.) en la misma molécula. El agua se muestra como un extractante relativamente bueno, aunque la menor solubilidad de los compuestos fenólicos y la posible mayor incidencia de procesos de oxidación (química y enzimática) ocasionan una pérdida significativa en el rendimiento de la extracción con respecto al metanol.

4.1.2.- DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.

La Figura 4.2 muestra la capacidad antioxidante de los extractos, obtenidos de vástagos de plantas de *T. membranaceus* cultivadas *in vitro* durante 5 meses, con los tres disolventes ensayados y expresada como capacidad desactivadora del radical DPPH. Como se observa en dicha figura, los extractos metanólicos son los que muestran una mayor actividad atrapadora de esta radical, pudiendo estar esta actividad directamente relacionada con el mayor contenido en compuestos fenólicos solubles.

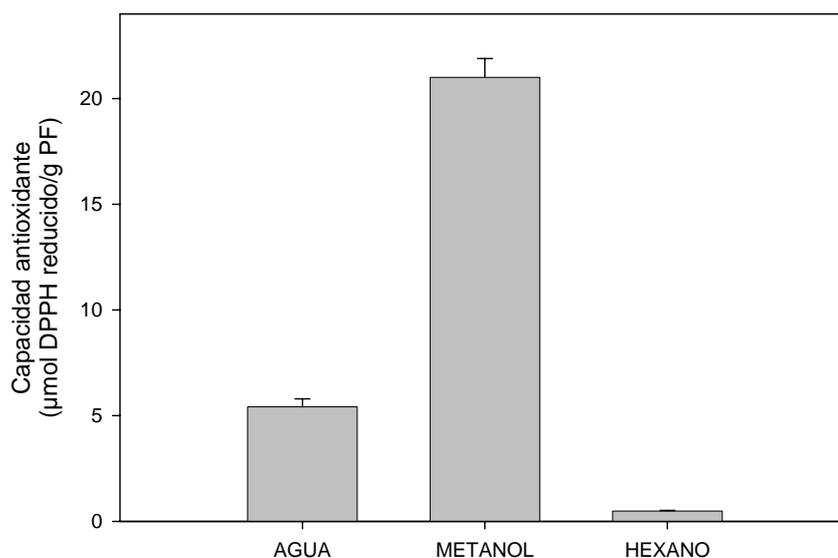


Figura 4.2.- Efecto del disolvente sobre la capacidad atrapadora del radical DPPH en extractos obtenidos de vástagos de plantas de *T. membranaceus* cultivadas *in vitro* durante 5 meses. Las barras representan el error estándar de las determinaciones.

Otro ensayo de la capacidad antioxidante basado en la desactivación de una especie radical es el de la decoloración del catión radical del ABTS. Los resultados obtenidos con los extractos acuosos, metanólicos y de hexano de los vástagos de *T. membranaceus* se muestran en la Figura 4.3. Como se observa en dicha figura, el patrón observado con este ensayo es similar, tanto cualitativa, como cuantitativamente al observado en el ensayo con DPPH. Tanto el radical del DPPH como el del ABTS son radicales de nitrógeno, por lo que cabe esperar este comportamiento similar. Sin embargo, mientras que en el caso de los extractos obtenidos con agua y con hexano apenas se observan diferencias cuantitativas entre ambos ensayos, en el caso de los extractos metanólicos se observan diferencias significativas (Figuras 4.2 y 4.3). El carácter catiónico del radical del ABTS, que podría implicar diferencias en las cinéticas de reacción entre los diferentes constituyentes de los extractos, explicaría esta observación que ha sido descrita en investigaciones llevadas a cabo por otros investigadores (Miliauskas *et al.*, 2004).

En resumen, los resultados obtenidos con estos ensayos basados en la capacidad de desactivar especies radicales sugieren que los compuestos presentes en los extractos podrían impedir el daño provocado por radicales libres en el ADN, proteínas, lípidos y

otras biomoléculas en alimentos y en otros sistemas biológicos susceptibles (Halliwell *et al.*, 1995).

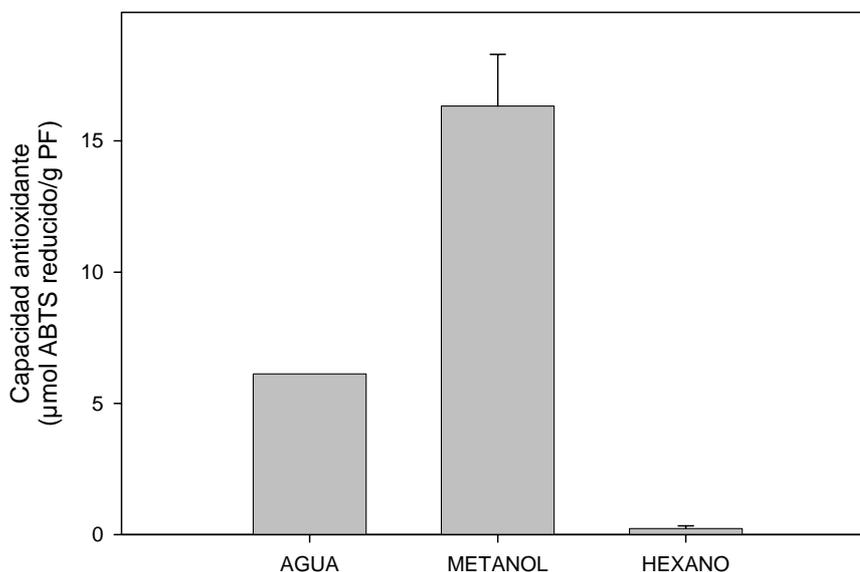


Figura 4.3.- Efecto del disolvente sobre la capacidad atrapadora del catión radical ABTS en extractos obtenidos de vástagos de plantas de *T. membranaceus* cultivadas *in vitro* durante 5 meses. Las barras representan el error estándar de las determinaciones.

Además de los ensayos de desactivación de radicales libres, la capacidad antioxidante se determinó mediante dos métodos basados en la capacidad de los extractos para reducir el Fe(III) a Fe(II). Uno de dichos ensayos es el denominado “poder reductor”, que se fundamenta en la reducción del ferricianuro a ferrocianuro y en la posterior formación del ferrocianuro férrico en medio ácido. Los resultados obtenidos con los extractos acuosos, metanólicos y de hexano, referidos a equivalentes de ácido ascórbico, se muestran en la Figura 4.4. En dicha figura se observa que, nuevamente la mayor actividad antioxidante se encuentra asociada a los extractos metanólicos de los vástagos, siendo la actividad asociada a los extractos acuosos aproximadamente un tercio de la anterior y la de los extractos con hexano prácticamente despreciable.

Resultados similares se obtuvieron con el otro ensayo basado en la reducción del Fe(III), el denominado FRAP (Figura 4.5). En este caso, las actividades antioxidantes mantienen las mismas proporciones que en el ensayo del poder reductor.

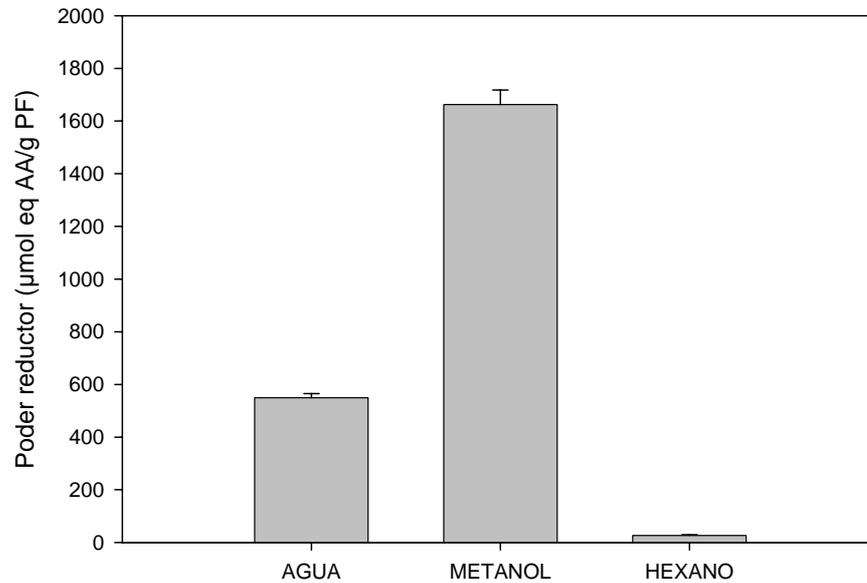


Figura 4.4.- Medida del poder reductor (expresado en equivalentes de ácido ascórbico) en los extractos de vástagos de *T. membranaceus* obtenidos con los diferentes disolventes. Las barras representan los errores estándar de las determinaciones.

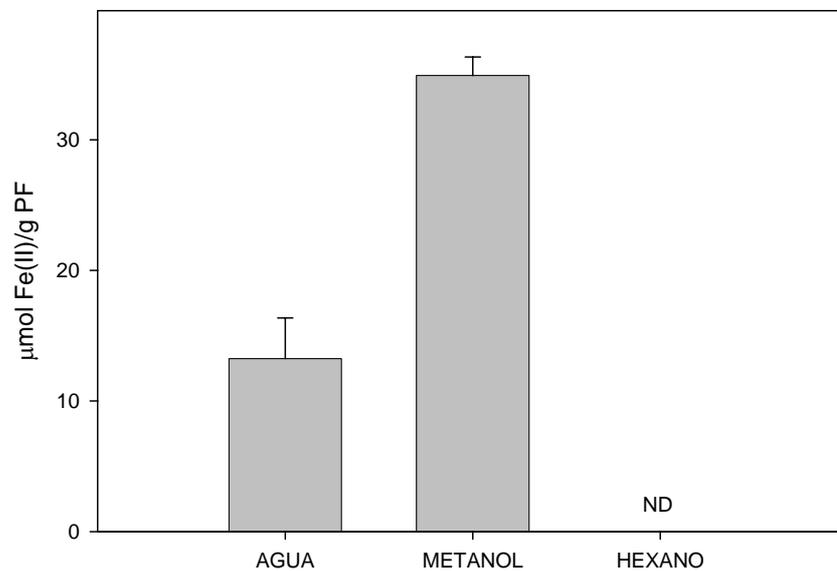


Figura 4.5.- Ensayo FRAP en los extractos de vástagos de *T. membranaceus* obtenidos con los diferentes disolventes. Las barras representan los errores estándar de las determinaciones. ND, no determinado.

La capacidad reductora determinada podría estar asociada a la fracción de compuestos fenólicos (Yildirim et al., 2000). Los datos obtenidos de estos ensayos de reducción del

hierro por los extractos sugieren que los compuestos presentes en los mismos podrían ceder uno o varios electrones a radicales reactivos, transformándolos en especies más estables y, por lo tanto, menos reactivas.

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), son particularmente susceptibles a la abstracción de un átomo de hidrógeno en la posición contigua a un doble enlace. Debido a la estabilización por resonancia de las especies radicales intermediarias, la reacción es usualmente acompañada de reordenamientos de los dobles enlaces produciéndose la formación de dienos conjugados de hidroperóxidos (Kim y Nawar,1993). La presencia de compuestos antioxidantes puede romper la cadena de intermedios radicales, evitando la formación de los dienos conjugados. Este es el fundamento de otro ensayo para determinar la actividad antioxidante de compuestos aislados o mezclas (más o menos) complejas de los mismos.

Los resultados de la realización de este ensayo utilizando los extractos acuosos, metanólicos y de hexano obtenidos a partir de los vástagos de plantas de *T. membranaceus* cultivadas *in vitro* durante 5 meses, se muestran en la Figura 4.6.

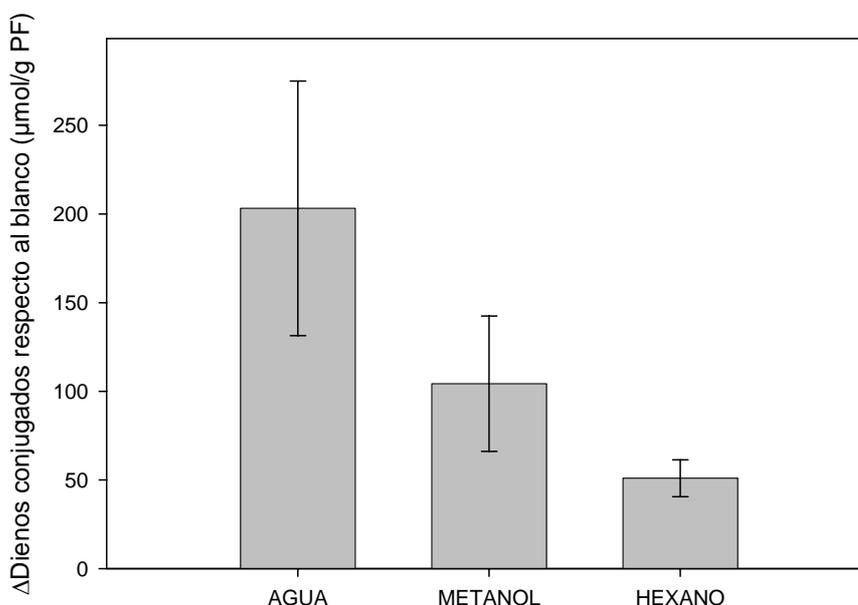


Figura 4.6.- Ensayo de la formación de dienos conjugados utilizando los extractos de vástagos de *T. membranaceus* con los diferentes disolventes objeto de estudio. Las barras representan los errores estándar de las determinaciones.

En la Figura 4.6 se observa que, aunque las diferencias no son significativas por el error asociado a las determinaciones, los extractos con componentes más hidrofílicos muestran una mayor capacidad antioxidante. En condiciones normales la peroxidación de lípidos se produce en el seno de las membranas biológicas, es decir en ambientes muy hidrofóbicos. Por lo tanto, resulta paradójico que sean los compuestos que presentan mayor polaridad los que muestren una mayor actividad inhibidora de la formación de dienos conjugados. Las evidencias acumuladas en este sentido han dado forma a lo que se conoce como la “paradoja polar” (Frankel *et al.*, 1996).

4.2.- EFECTO DEL ÁCIDO SALICÍLICO SOBRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN PLANTAS DE *Thymus membranaceus* CULTIVADAS IN VITRO.

A continuación se presentan los resultados de los diferentes análisis de la capacidad antioxidante de plantas de tomillo cultivadas *in vitro* en medios suplementados con diferentes concentraciones de ácido salicílico.

El objetivo de este estudio es comparar los resultados obtenidos con los descritos anteriormente con el fin de comprobar si hay diferencias significativas en la producción de antioxidantes en la planta de tomillo en presencia de ácido salicílico, así como establecer qué concentración es la más indicada para la producción de antioxidantes.

4.2.1.- VIABILIDAD DE LAS PLANTAS DE *Thymus membranaceus* CULTIVADAS EN MEDIOS CON ÁCIDO SALICÍLICO.

La tasa de supervivencia de los segmentos nodales incubados en medios conteniendo concentraciones crecientes de ácido salicílico se muestra en la Figura 4.7. En dicha figura se observa que concentraciones de salicílico de 1 mM provocan una caída muy

acusada de la viabilidad de los explantes. La observación de dichos explantes muestra que los tejidos aparecen necrosados y en los casos en los que hay crecimiento, éste es muy limitado (Figura 4.8).

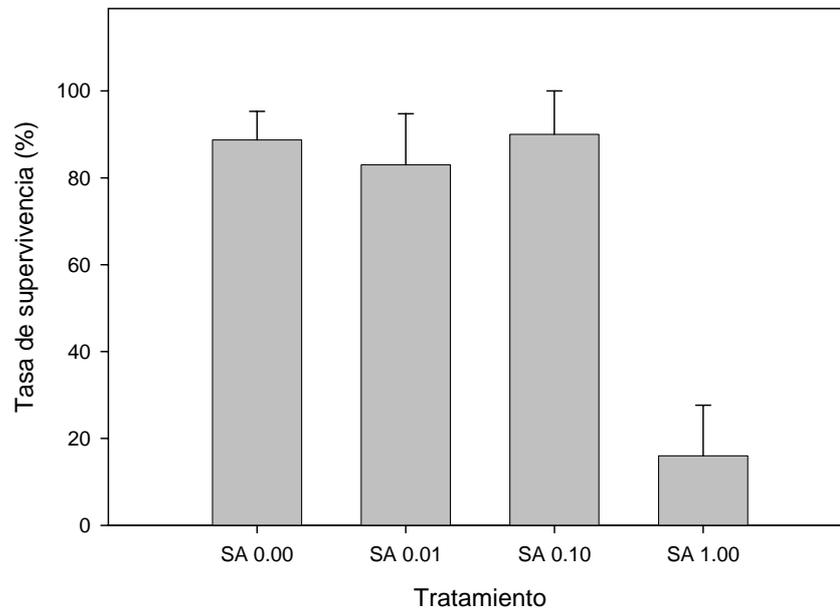


Figura 4.7.- Tasa de supervivencia de explantes de *T. membranaceus* después de ocho semanas de cultivo. Las barras representan el error estándar asociado a las determinaciones.



Figura 4.8.- Fotografía de un segmento nodal de *T. membranaceus* cultivado durante 1 mes en un medio que contenía ácido salicílico 1 mM.

En cuanto al resto de concentraciones de ácido salicílico, a medida que crece la concentración del ácido disminuye el crecimiento del material vegetal, aun cuando la supervivencia de los explantes no se ve afectada de forma significativa (Figuras 4.9, 4.10 y 4.11).

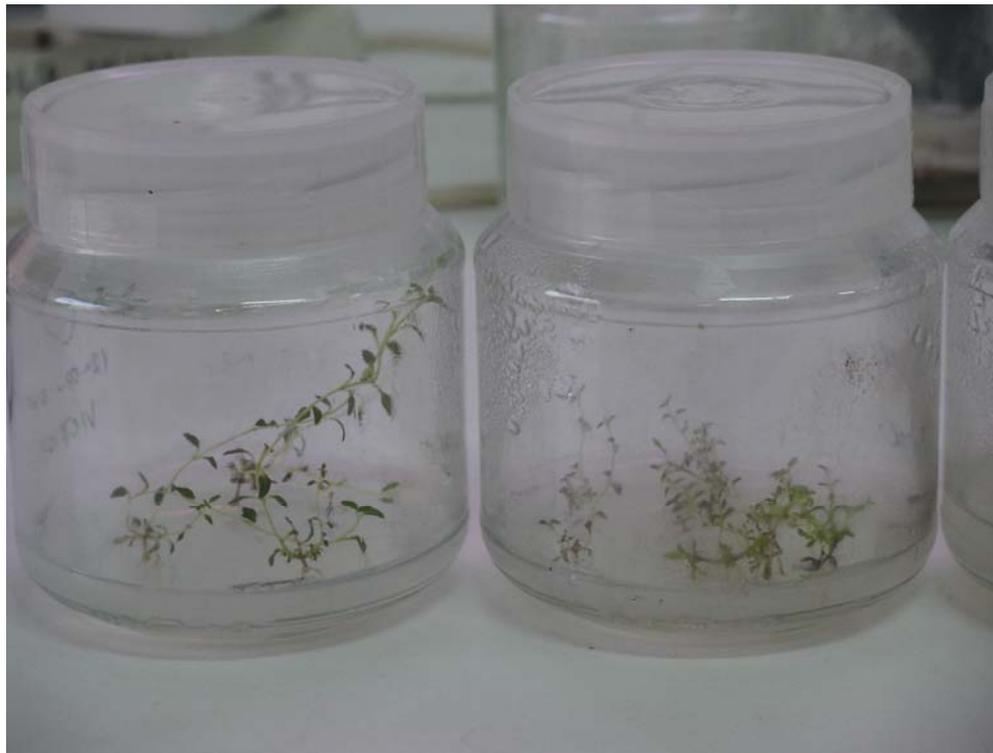


Figura 4.9.- Plantas de *T. membranaceus* cultivadas durante dos meses en medios que contenían ácido salicílico 0.00 mM (izquierda) y 0.01 mM (derecha).



Figura 4.10.- Plantas de *T. membranaceus* cultivadas durante dos meses en medios que contenían ácido salicílico 0.00 mM (izquierda) y 0.10 mM (derecha).

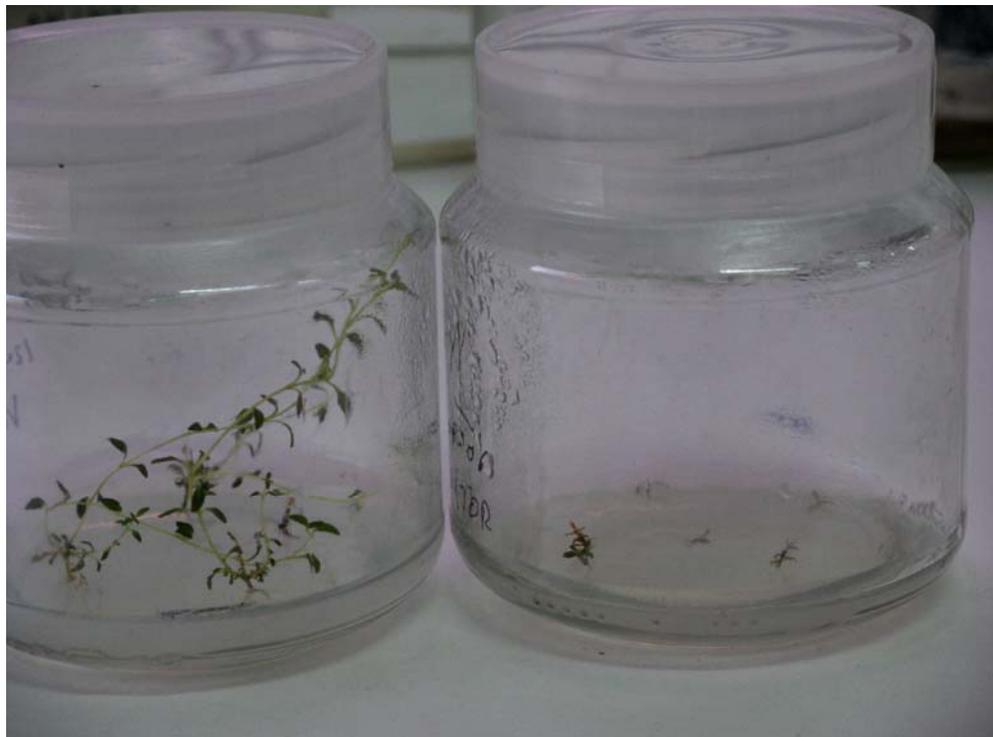


Figura 4.11.- Plantas de *T. membranaceus* cultivadas durante dos meses en medios que contenían ácido salicílico 0.00 mM (izquierda) y 1.00 mM (derecha).

El ácido salicílico parece jugar un papel fundamental en los mecanismos de defensa de las plantas, activando rutas que conducen a la expresión de fenómenos de resistencia. El efecto activador del ácido salicílico podría estar mediado por especies oxidantes (Garretón *et al.*, 2002). Si la intensidad del estrés oxidativo es proporcional a la concentración de ácido salicílico suministrado, los resultados obtenidos quedarían completamente explicados.

Por otra parte, cabe esperar que la respuesta defensiva de las plantas inducida por el ácido salicílico (y mediada por una situación de estrés oxidativo) desencadene la producción de aquellos compuestos que forman parte de dicha respuesta. Muchos de los denominados metabolitos de estrés de las plantas presentan un marcado carácter antioxidante, por lo que la inducción con ácido salicílico podría constituir un procedimiento válido para la producción de este tipo de compuestos en materiales vegetales.

Para comprobar esta hipótesis se llevaron a cabo las determinaciones descritas en el apartado anterior. Dado que no pudo obtenerse suficiente material vegetal correspondiente al tratamiento de los segmentos nodales con una concentración de ácido salicílico 1 mM, el estudio quedó limitado a los tratamientos restantes (0.00; 0.01 y 0.10 mM).

4.2.2.- CONTENIDO EN CLOROFILAS, CAROTENOIDES Y FENOLES SOLUBLES TOTALES PRESENTES EN LOS EXTRACTOS.

En la Tabla 4.II se muestran los resultados de los análisis de clorofilas y carotenoides del material vegetal incubado durante 2 meses con diferentes concentraciones de ácido salicílico. Como puede observarse en dicha tabla, los niveles de clorofila total y de carotenoides totales aumentan a medida que aumenta la concentración de salicílico en los medios de cultivo.

Aunque los niveles de clorofilas no son muy elevados, posiblemente como consecuencia de la baja intensidad luminosa de la cámara en la que mantuvieron los

frascos de cultivo, el tratamiento con ácido salicílico 0.10 mM provoca un aumento significativo en los niveles de estos pigmentos con respecto al control y casi duplica los valores encontrados en las determinaciones con plantas de 5 meses anteriormente descritas (Tabla 4.I).

Tabla 4.II.- Efecto de la concentración de ácido salicílico sobre los contenidos de clorofilas y carotenoides totales (expresados en μg de compuesto por g de peso fresco de vástago) en vástagos de *T. membranaceus* tras 2 meses de subcultivo. Cl_{Tot} , clorofilas totales; $\text{C}_{\text{x+c}}$, carotenoides totales (xantofilas más carotenos).

[Salicílico] (mM)	Cl _a	Cl _b	Cl _{Tot}	Cl _a /Cl _b	C _{x+c}	Cl _{Tot} /C _{x+c}
0.00	183.33	102.52	285.85	1.79	19.43	14.71
0.01	205.10	108.88	313.98	1.88	26.56	11.82
0.10	299.41	162.28	461.69	1.85	41.39	11.15

En cuanto a los carotenoides totales, también experimentan un aumento en función de la concentración de ácido salicílico en los medios de cultivo, lo cual podría conducir a una mejor adaptación del cloroplasto a condiciones que provoquen un estrés oxidativo. La relación clorofilas totales/carotenoides disminuye al aumentar la concentración de salicílico, lo que abunda en una mejor aptitud de la planta para tolerar condiciones desfavorables.

En cuanto a los niveles de fenoles solubles totales presentes en los vástagos de *T. membranaceus* tratados con ácido salicílico, los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.12. En ella se observa que la mayor concentración de fenoles solubles se encuentra en los segmentos nodales incubados en presencia de una concentración de ácido salicílico 0.01 mM. La pequeña diferencia encontrada entre este material y el tratado con salicílico 0.10 mM podría deberse a que un aumento en los niveles de estrés oxidativo conduciría a una mayor incidencia de polímeros fenólicos formados por acoplamiento oxidativo de los fenoles solubles, tal y como se ha observado en otros sistemas modelo (López Arnaldos *et al.*, 2001). En su estado condensado, estos compuestos fenólicos serían difícilmente extraíbles en las condiciones ensayadas.

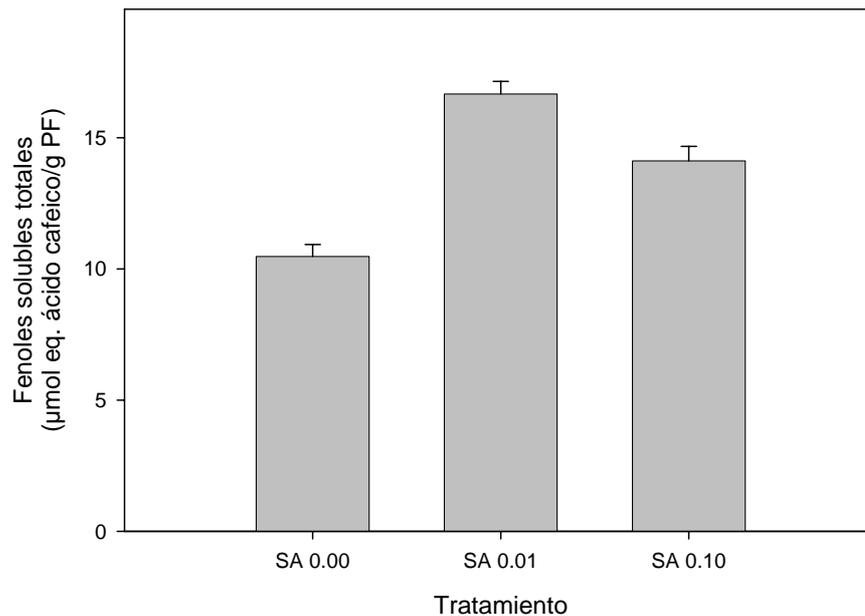


Figura 4.12.- Contenido en fenoles solubles totales extraídos de vástagos de *T. membranaceus* cultivados durante 2 meses en diferentes concentraciones de ácido salicílico. Las barras representan el error estándar de las determinaciones.

4.2.3.- DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.

En la Figura 4.13 se muestra el efecto de la incubación con concentraciones crecientes de ácido salicílico sobre la capacidad antioxidante, medida como capacidad atrapadora del radical DPPH, de los extractos obtenidos de los vástagos de plantas de *T. membranaceus*. Como se puede observar en dicha figura, el tratamiento con salicílico 0.01 mM es el que provoca una mayor acumulación de compuestos desactivadores del radical DPPH, lo cual podría estar correlacionado con los mayores niveles de fenoles solubles totales descritos en el apartado anterior.

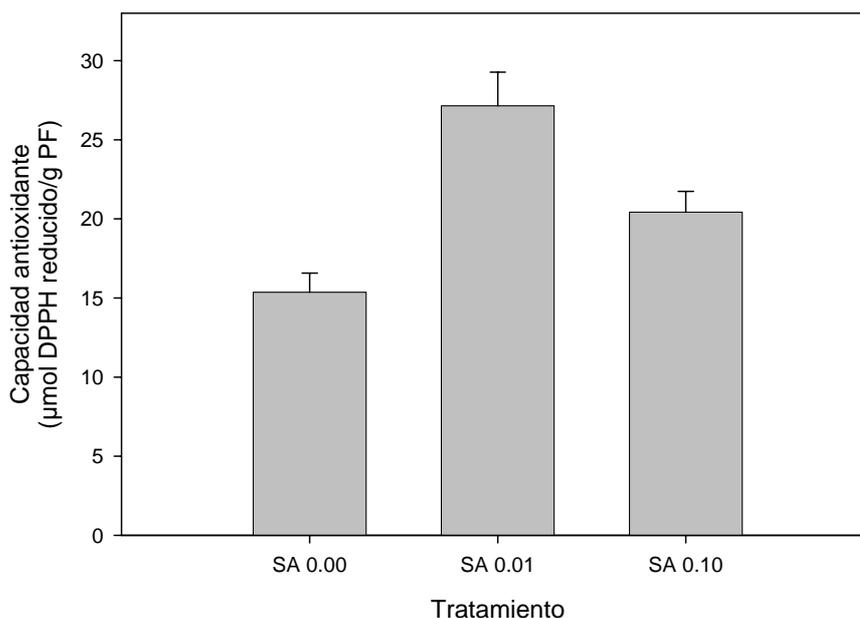


Figura 4.13.- Efecto del ácido salicílico sobre la capacidad atrapadora del radical DPPH en extractos obtenidos de vástagos de plantas de *T. membranaceus* cultivadas *in vitro* durante 2 meses. Las barras representan el error estándar de las determinaciones.

En cuanto al otro ensayo de la actividad antioxidante basado en la desactivación de radicales centrados en átomos de nitrógeno, el del ABTS, los resultados se muestran en la Figura 4.14. En dicha figura se observa que el comportamiento es ligeramente diferente al del ensayo con DPPH. Así, desde un punto de vista cuantitativo, los niveles de actividad son mayores en el ensayo con ABTS que en el ensayo con DPPH, a diferencia de lo que ocurría con el material cultivado durante 5 meses (Figuras 4.2 y 4.3). Diferencias en el patrón de compuestos antioxidantes debidas a los diferentes estados de desarrollo, con el consiguiente cambio en los mecanismos de reacción entre antioxidantes y los radicales, podrían ayudar a entender esta modificación del comportamiento.

Por otra parte, las diferencias encontradas en el ensayo con el DPPH entre los dos tratamientos con ácido salicílico, no se observan en el ensayo con el catión radical del ABTS, aunque sí es significativo el aumento en actividad antioxidante con respecto a las plantas no tratadas (Figura 4.14).

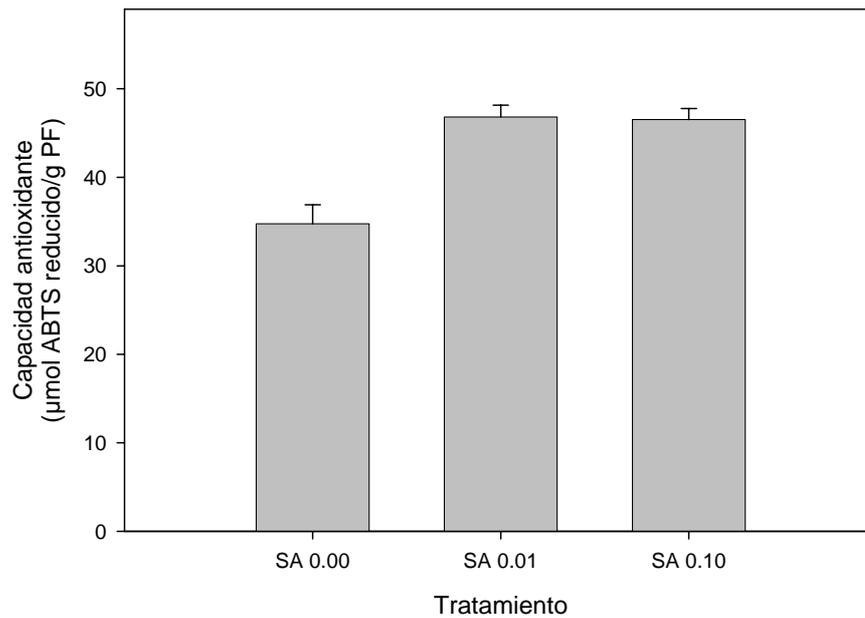


Figura 4.14.- Efecto del ácido salicílico sobre la capacidad atrapadora del catión radical ABTS en extractos obtenidos de vástagos de plantas de *T. membranaceus* cultivadas *in vitro* durante 2 meses. Las barras representan el error estándar de las determinaciones.

Con respecto a los ensayos de la capacidad antioxidante basados en la reducción de Fe(III) a Fe(II), en ambos (poder reductor y FRAP) se encontraron resultados similares, siendo los extractos procedentes del material vegetal incubado con una concentración de ácido salicílico 0.01 mM los que mostraron una mayor actividad antioxidante (Figuras 4.15 y 4.16). La falta de inducción, en el caso del material no tratado, o un estado redox más oxidado por incidencia de un estrés oxidativo más acusado, en el caso del material tratado con salicílico 0.10 mM, podría ser la justificación de este comportamiento.

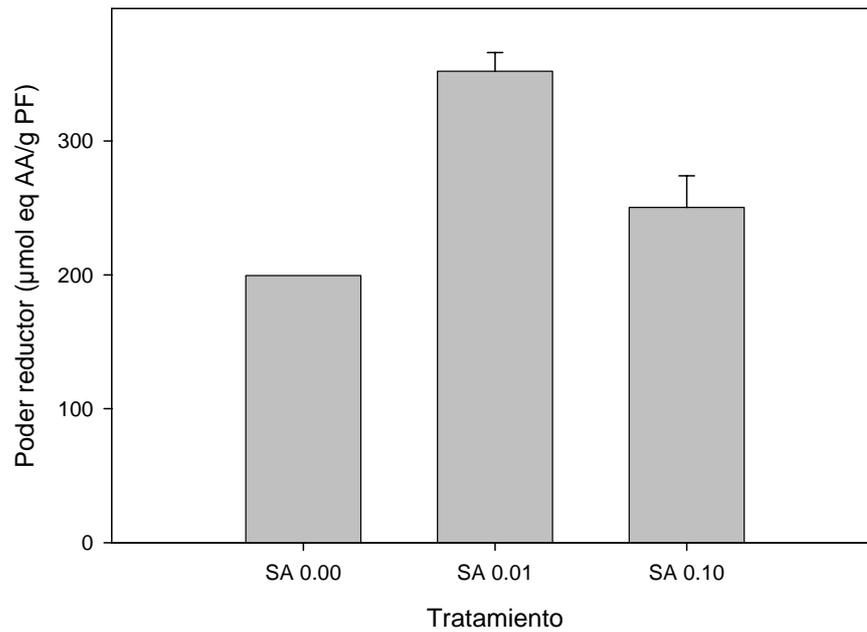


Figura 4.15.- Medida del poder reductor (expresado en equivalentes de ácido ascórbico) en los extractos de vástagos de *T. membranaceus* procedentes de los tratamientos con ácido salicílico. Las barras representan los errores estándar de las determinaciones.

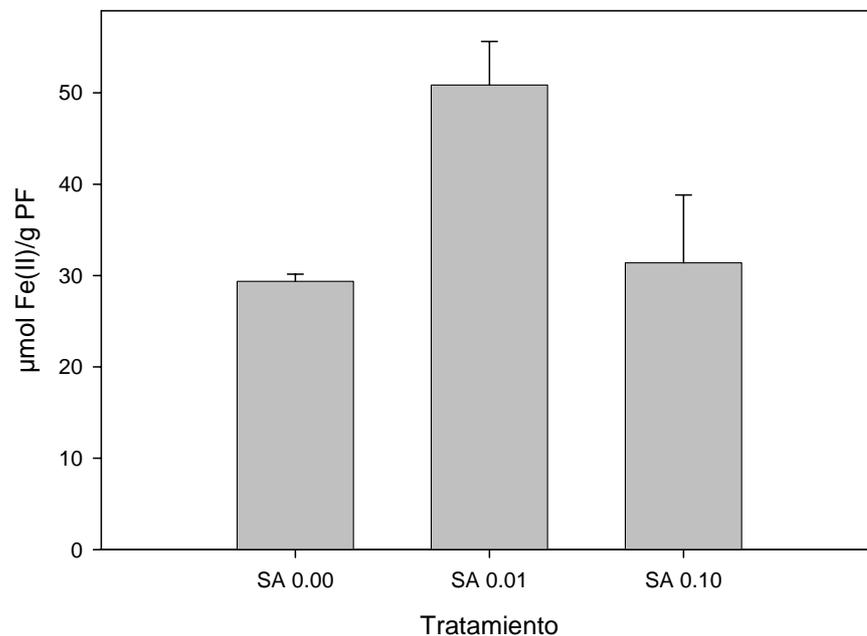


Figura 4.16.- Ensayo FRAP en los extractos de vástagos de *T. membranaceus* tratados con diferentes concentraciones de ácido salicílico. Las barras representan los errores estándar de las determinaciones.

Por último, en el ensayo de la capacidad antioxidante basado en la inhibición de la formación de dienos conjugados, al igual que sucedía en el caso de los extractos de vástagos cultivados durante 5 meses, se produce una variación con respecto a la pauta seguida en el resto de ensayos. Así, el extracto que muestra una mayor actividad antioxidante es el de vástagos incubados con 0.10 mM de salicílico (Figura 4.17). Esta mayor actividad podría estar correlacionada con el aumento en carotenoides detectado en las plantas tratadas con esa concentración del inductor.

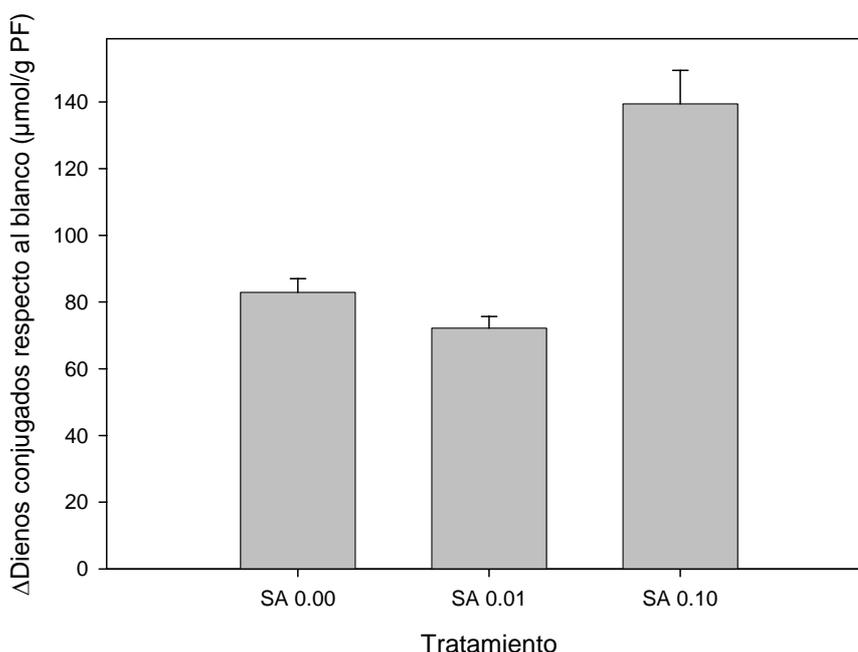


Figura 4.17.- Ensayo de la formación de dienos conjugados utilizando los extractos de vástagos de *T. membranaceus* cultivados durante 2 meses en diferentes concentraciones de ácido salicílico. Las barras representan los errores estándar de las determinaciones.

4.2.4.- DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES INDIVIDUALES POR HPLC.

Los cromatogramas obtenidos a 280 nm y a 320 nm de los extractos nativos e hidrolizados químicamente procedentes de los vástagos de material vegetal tratado con ácido salicílico se muestra en las Figuras 4.18-4.23. A partir de los datos de tiempo de retención y de los espectros de los picos a las diferentes longitudes de onda, se puede afirmar que en los extractos metanólicos de *T. membranaceus* el principal compuesto

presente es el ácido rosmarínico, pudiendo identificarse la presencia de pequeñas cantidades de ácido cafeico.

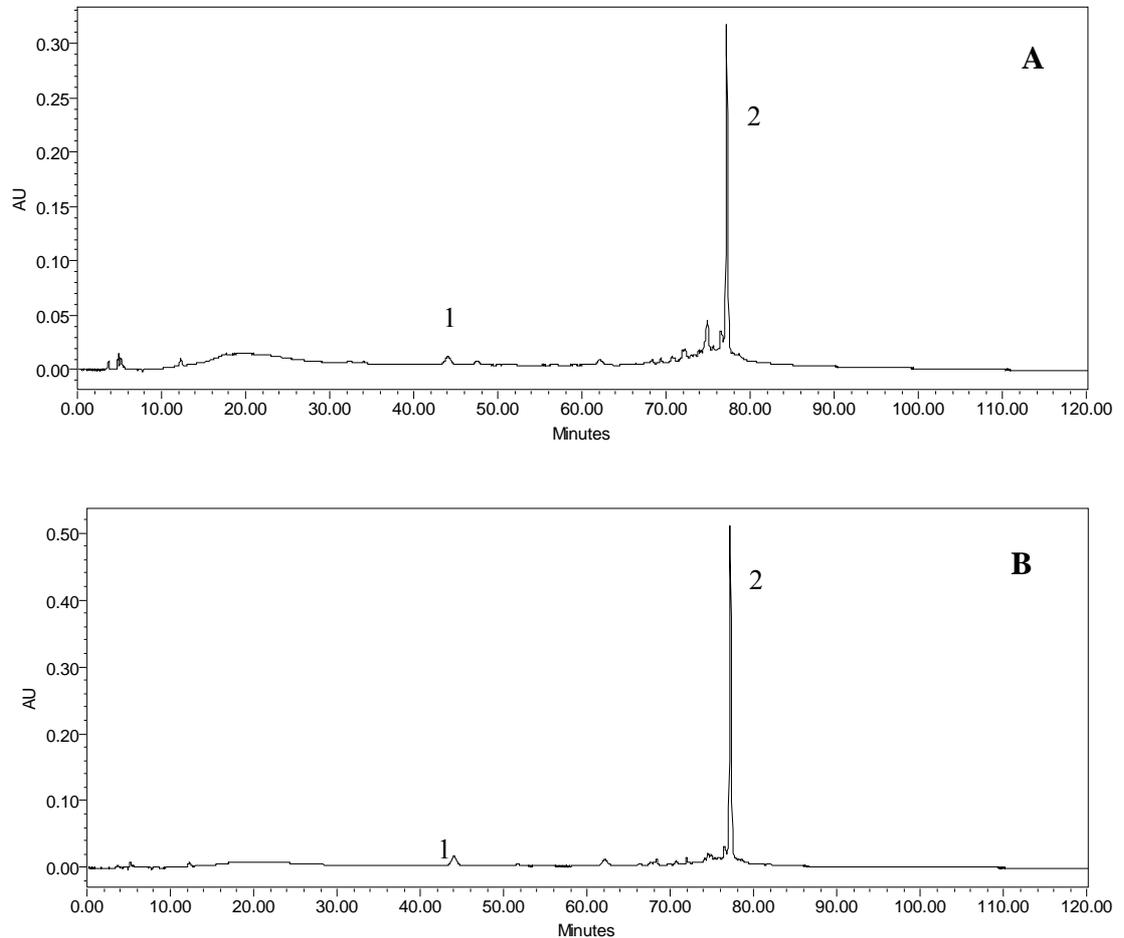


Figura 4.18.- Cromatogramas a 280 nm (A) y a 320 nm (B) de extractos nativos procedentes de vástagos de plantas control de *T. membranaceus*. 1, ácido cafeico; 2, ácido rosmarínico.

En el caso de los extractos hidrolizados se observa una disminución del pico correspondiente al ácido rosmarínico y la aparición a tiempos muy cortos de un pico intenso con un espectro similar al de un ácido hidroxicinámico (1max alrededor de 330 nm, datos no mostrados) (Figuras 4.19, 4.21 y 4.23). Probablemente, las condiciones de hidrólisis (medio fuertemente ácido, periodo de tiempo prolongado) llevan a la descomposición del ácido rosmarínico.

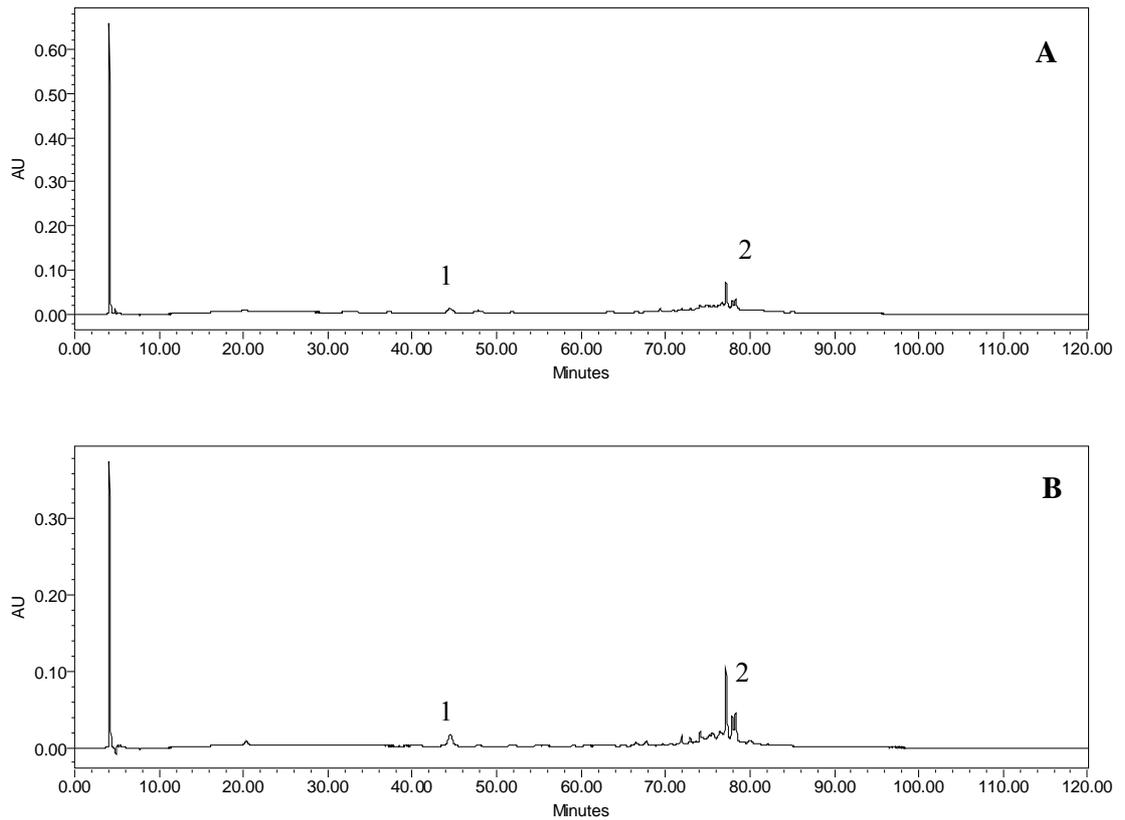


Figura 4.19.- Cromatogramas a 280 nm (A) y a 320 nm (B) de extractos hidrolizados procedentes de vástagos de plantas control de *T. membranaceus*. 1, ácido cafeico; 2, ácido rosmarínico.

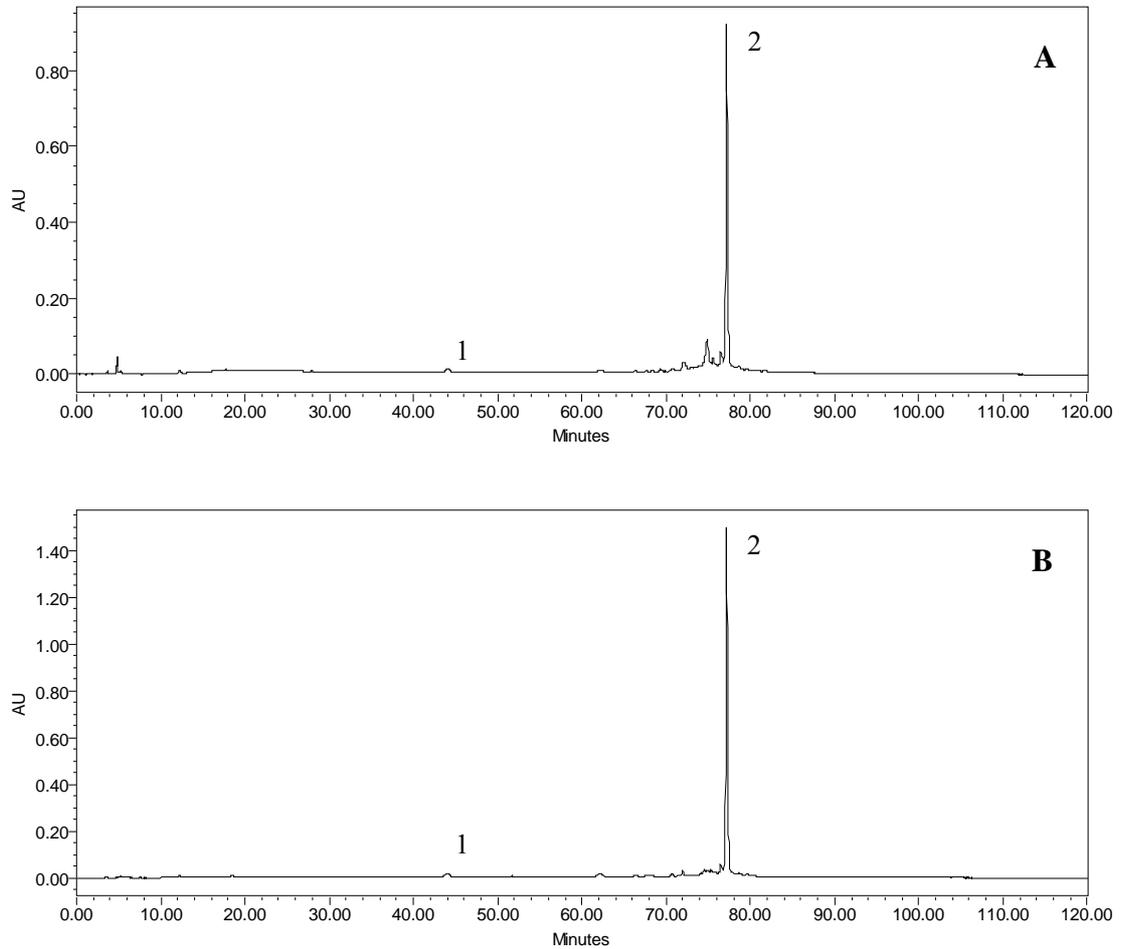


Figura 4.20.- Cromatogramas a 280 nm (A) y a 320 nm (B) de extractos nativos procedentes de vástagos de plantas de *T. membranaceus* tratadas con 0.01 mM de ácido salicílico. 1, ácido cafeico; 2, ácido rosmarínico.

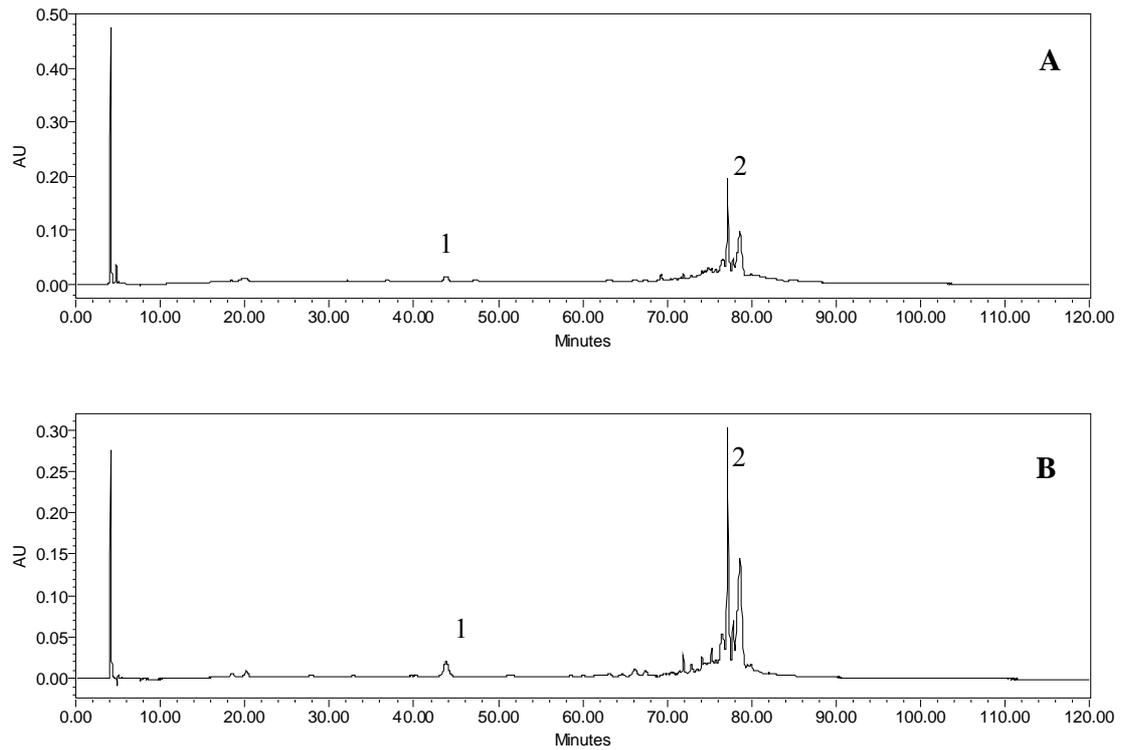


Figura 4.21.- Cromatogramas a 280 nm (A) y a 320 nm (B) de extractos hidrolizados procedentes de vástagos de plantas de *T. membranaceus* tratadas con 0.01 mM de ácido salicílico. 1, ácido cafeico; 2, ácido rosmarínico.

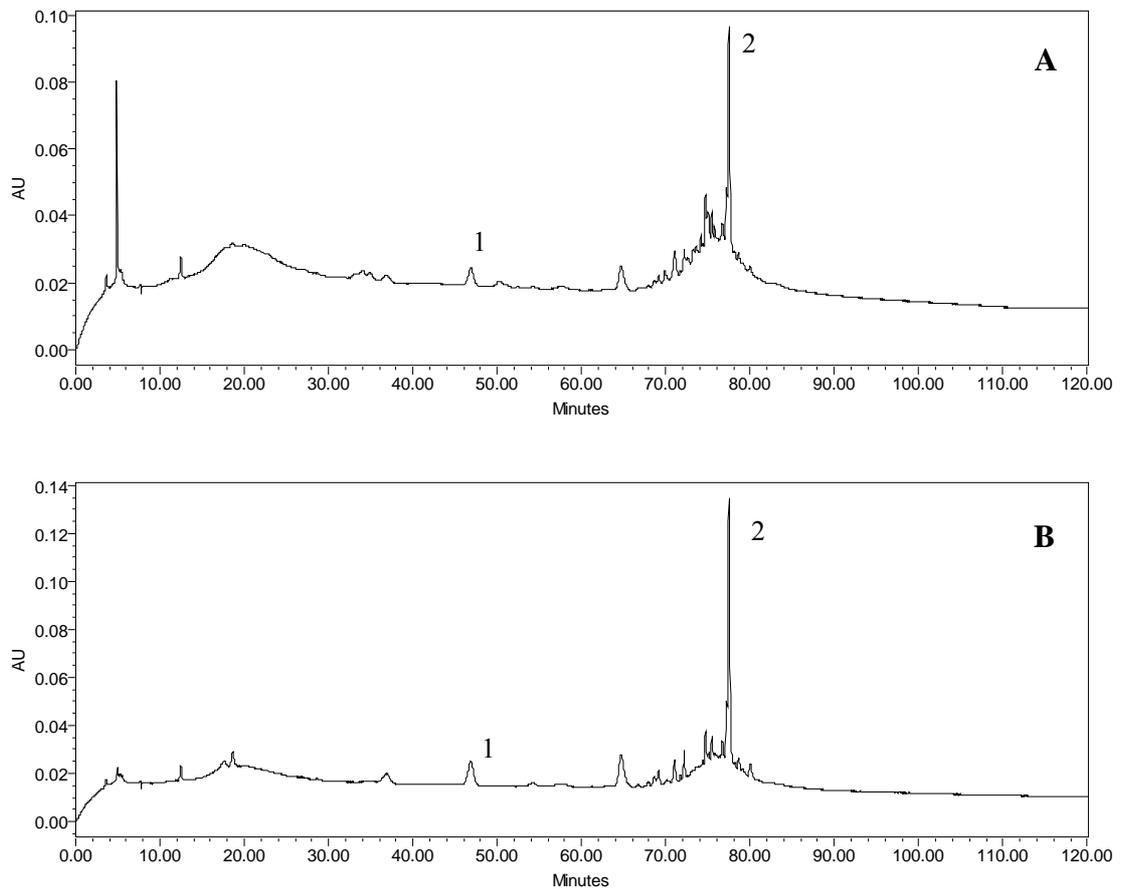


Figura 4.22.- Cromatogramas a 280 nm (A) y a 320 nm (B) de extractos nativos procedentes de vástagos de plantas de *T. membranaceus* tratadas con 0.10 mM de ácido salicílico. 1, ácido cafeico; 2, ácido rosmarínico.

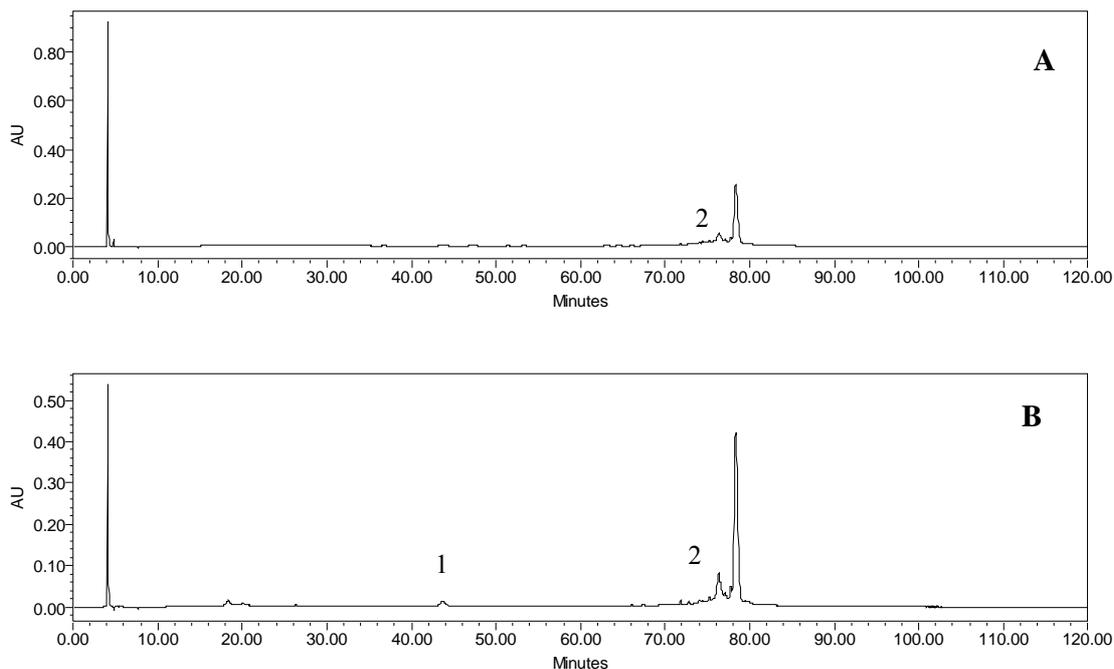


Figura 4.23.- Cromatogramas a 280 nm (A) y a 320 nm (B) de extractos hidrolizados procedentes de vástagos de plantas de *T. membranaceus* tratadas con 0.10 mM de ácido salicílico. 1, ácido cafeico; 2, ácido rosmarínico.

La cuantificación de los niveles de ácido cafeico y ácido rosmarínico, calculados a partir de las áreas de los picos correspondientes a estos compuestos, determinadas a 325 nm y a 330 nm, respectivamente, se muestra en las Figuras 4.24 y 4.25. En estas figuras se observa, por una parte, que los niveles de ácido cafeico aumentan ligeramente con el aumento de la concentración de ácido salicílico aplicado a los cultivos. Además, la concentración de cafeico en los extractos aumenta también tras la hidrólisis con ácido clorhídrico, lo que sugiere la presencia en los extractos de formas conjugadas del ácido cafeico (Figura 4.24).

En cuanto al ácido rosmarínico, en la Figura 4.25 se observa que la concentración de este compuesto en los extractos es máxima para el tratamiento con ácido salicílico 0.01 mM, disminuyendo drásticamente los niveles de rosmarínico a una concentración mayor de salicílico. El tratamiento ácido de los extractos provoca una disminución acusada de la concentración de ácido rosmarínico y la aparición de un pico a tiempos de retención mayores al de este compuesto. Este pico presenta un espectro de absorción similar al del

rosmarínico (datos no mostrados), por lo que pudiera tratarse de un isómero o de un producto de condensación del tipo del ácido litospérmico B o ácido salvianólico B.

El ácido rosmarínico es un éster derivado de los ácidos cafeico y 3,4-dihidroxifenil-láctico ampliamente distribuido entre las especies de las familias de las labiadas y las boragináceas. Presenta multitud de actividades biológicas, siendo su actividad antioxidante bastante significativa y comparable, o incluso superior dependiendo del ensayo realizado, a la del tocoferol (Ly *et al.*, 2006). Además, presenta otra serie de actividades, como antiinflamatoria, antibacteriana y antiviral que lo hacen muy valioso para las industrias farmacéutica y cosmética.

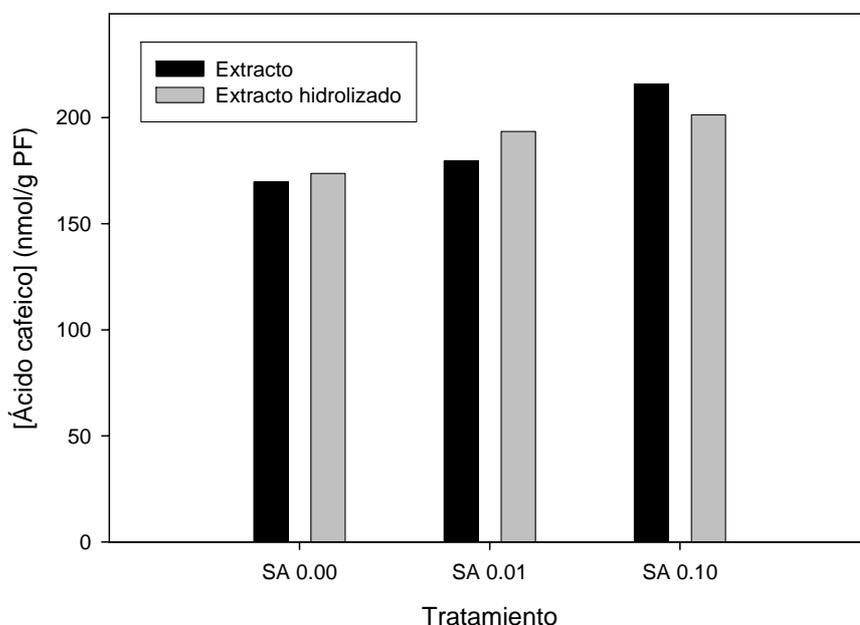


Figura 4.24.- Niveles de ácido cafeico en los extractos obtenidos a partir de vástagos de *T. membranaceus* tratados con diferentes concentraciones de ácido salicílico. La cuantificación se realizó a partir de las áreas de los cromatogramas a 325 nm.

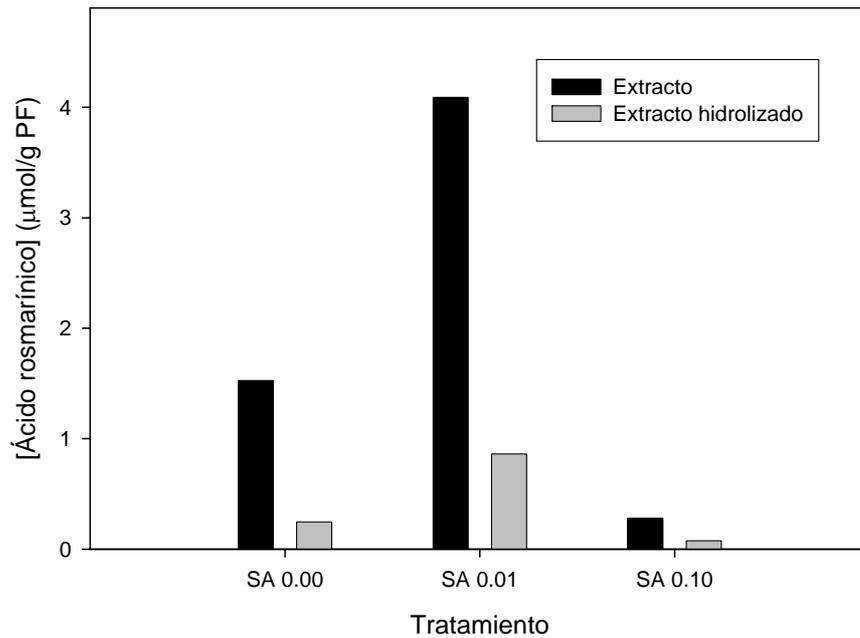


Figura 4.25.- Niveles de ácido rosmarínico en los extractos obtenidos a partir de vástagos de *T. membranaceus* tratados con diferentes concentraciones de ácido salicílico. La cuantificación se realizó a partir de las áreas de los cromatogramas a 330 nm.

5.- CONCLUSIONES.

5.- CONCLUSIONES.

1.- De los tres disolventes ensayados (agua, metanol y hexano) para la extracción de compuestos antioxidantes presentes en vástagos de plantas de *Thymus membranaceus* cultivados *in vitro*, el metanol es el que ofrece una mayor recuperación de compuestos con actividad antioxidante, cuando esta actividad se ensaya determinando la capacidad desactivadora de radicales libres y la capacidad para reducir el Fe(III) a Fe(II). En el caso del ensayo de la actividad antioxidante determinada por la inhibición de la formación de dienos conjugados, parece observarse una tendencia a disminuir el poder antioxidante de los extractos a medida que disminuye la polaridad del disolvente.

2.- La inclusión de ácido salicílico en los medios de cultivo de los segmentos nodales de *T. membranaceus* provoca un claro efecto sobre el desarrollo del material vegetal. A medida que aumenta la concentración de salicílico en el medio, disminuye el crecimiento de los vástagos y aumentan las concentraciones de pigmentos fotosintéticos en los tejidos. La tasa de supervivencia de los explantes disminuye de forma muy marcada para concentraciones de ácido salicílico de 1 mM, siendo similar a la de los medios sin el ácido para el resto de concentraciones.

3.- El tratamiento con ácido salicílico provoca un aumento en la concentración de fenoles solubles totales en los vástagos de *T. membranaceus* tras dos meses de cultivo. Los niveles de compuestos fenólicos son máximos para una concentración de salicílico de 0.01 mM.

4.- El efecto de la concentración de ácido salicílico sobre la capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de vástagos de *T. membranaceus*, determinada por la actividad desactivadora de radicales libres y por la capacidad reductora de Fe(III), muestra un perfil similar al del contenido en fenoles solubles totales. En el caso del ensayo de la actividad inhibidora de la formación de dienos conjugados, es el tratamiento con ácido salicílico 0.10 mM el que muestra una mayor capacidad antioxidante.

5.- Los análisis cromatográficos de los extractos metanólicos obtenidos de vástagos de *T. membranaceus* cultivados en presencia de diferentes concentraciones de ácido salicílico muestran que el ácido rosmarínico es el componente mayoritario de los extractos, identificándose también la presencia de pequeñas cantidades de ácido cafeico.

6.- La mayor producción de ácido rosmarínico se da en los vástagos cultivados con ácido salicílico a una concentración de 0.01 mM, disminuyendo drásticamente (incluso por debajo de las plantas no tratadas) el contenido de rosmarínico en vástagos incubados con salicílico 0.10 mM.

6. BIBLIOGRAFÍA.

6. BIBLIOGRAFÍA.

- Albu S, Joyce E, Paniwnyk L, Lorimer J, Mason T. (2004). Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrasonics Sonochemistry* 11: 261-265
- Alcolea JF, Cano A, Acosta M, Arnao MB. (2002). Hydrophilic and lipophilic antioxidant activities of grapes. *Nahrung* 46: 353-356
- Arango Y, Heise KP. (1998). Localization of alpha-tocopherol synthesis in chromoplast envelope membranes of *Capsicum annuum* L. fruits. *J. Exp. Bot.* 49: 1259-1262
- Arrigoni O, De Tullio MC. (2002). Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochim Biophys Acta* 1569: 1-9
- Asada K. (1984). Chloroplast: Formation of active oxygen and its scavenging. *Methods Enzymol.* 105: 422-429
- Bais HP, Walker TS, Schweizer HP, Vivanco JM. (2002). Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 983-995
- Benzie IFF, Strain JJ. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239: 70-76
- Brand Williams W, Cuvelier ME, Berset C. (1995). Use of the free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* 20: 25-30.
- Breusegem V, Vranová E, Dat JF, Inzé D. (2001). The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Sci.* **161**: 405-414
- Buettner GR, Jurkiewicz BA. (1996). Chemistry and biochemistry of ascorbic acid. En E Cadenas, L Packer, eds, *Handbook of Antioxidants*. Marcel Dekker, New York, pp 91-115
- Clement SA, Tan CC, Guo JL, Kitta K, Suzuki YJ. (2002). Roles of protein kinase C and alpha-tocopherol in regulation of signal transduction for GATA-4 phosphorylation in HL-1 cardiac muscle cells. *Free Radic. Biol. Med.* 32: 341-349
- Cvengros J. (1995). Physical Refining of Edible Oils. *JAOCS* 72: 1193-1196
- Damechki M, Sotiropoulou S, Tsimidou M. (2001). Antioxidant and pro-oxidant factors in oregano and rosemary gourmet olive oils. *Grasas y Aceites* 52: 207-213
- Decker EA. (1995). The role of phenolics, conjugated linoleic acid, carnosine, and pyrroloquinoline quinone as nonessential dietary antioxidants. *Nutr. Rev.* 53:49-58

- Demmig-Adams B, Gilmore AM, Adams WW. (1996). *In vivo* functions of carotenoids in higher plants. *FASEB J* 10: 403–412
- Dempsey D, Shah J, Klessig DF. (1999). Salicylic acid and disease resistance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18: 547–575
- Dixon RA, Paiva NL. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, 7: 1085-1097
- Driver JA, Kuniyuki AH. (1984). In vitro-propagation of paradox walnut rootstock. *HortSci.* 19: 507-509
- Durrant WE, Dong X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annu Rev. Phytopathol.* 42: 185–209
- Ferreres F, Tomás-Barberán FA, Tomás F. (1985). 5,6,4'-trihydroxy-7,8-dimethoxyflavone from *Thymus membranaceus*. *Phytochemistry* 24: 1869-1871
- Foyer CH, Halliwell B. (1976). The presence of glutathione and glutathione reductase: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133: 21–25
- Foyer CH, Noctor G. (2005). Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17: 1866-1875
- Frankel EN, Huang SW, Aeschbach R, Prior E. (1996). Antioxidant Activity of a Rosemary Extract and Its Constituents, Carnosic Acid, Carnosol, and Rosmarinic Acid, in Bulk Oil and Oil-in-Water Emulsion. *J. Agric. Food Chem.* 44: 131-135
- Frankel EN, Meyer AS. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J. Sci. Food Agric.* 80: 1925-1941
- Garretón V, Carpinelli J, Jordana X, Holuigue L. (2002). The *as-1* promoter element is an oxidative stress-responsive element and salicylic acid activates it via oxidative species. *Plant Physiol.* 130: 1516–1526
- Halliwell B. (2001). Vitamin C and genomic stability. *Mutat Res.* 475 :29-35
- Halliwell B, Aeschbach R, Löliger J, Aruoma OI. (1995). The characterization of antioxidants. *Food Chem.Toxicol.* 33: 601–617
- Halliwell B, Gutteridge JMC. (1989). En: *Free Radicals in Biology and Medicine*, Clarendon Press, Oxford
- Harborne JB. (1989). General procedures and measurement of total phenolics. En *Methods in Plant Biochemistry*, vol. 1, eds. P.M. Dey y J.B. Harborne, Academic Press, pp. 1-28

- Hernández E, Rathbone S. (1998). Fractionation of Lipids from Deodorizer Distillates by Short Path Distillation. *Processing and Products*. 89th AOCS Annual Meeting, Illinois, USA.
- Hui YH. (1996). *Bailey's Industrial Oil & Fat Products* Vol.(1-2). John Wiley & Sons
- Janda T, Szalai G, Tari I, Paldi E. (1999). Hydroponic treatment with salicylic acid decrease the effect of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta* **208**: 175–180
- Katalinic V, Milos M, Modun D, Music I, Boban M. (2004). Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. *Food Chem.* 86: 593-600
- Kim SK, Nawar WW, (1993). Parameters influencing cholesterol oxidation. *Lipids* 28: 917-921.
- Kusoski M, Asuero AG, Troncoso AM, Garcia-Parilla MC, Fett R. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Rev. Bras. Ciênc. Tecnol. Alim.* 24: 691-693
- Kwok D, Shetty K. (1998). Effects of proline and proline analogs on total phenolic and rosmarinic acid levels in shoot clones of thyme (*Thymus vulgaris* L.). *J. Food Biochem.* 22: 37-51
- Lajara MM, Calderón AA, Ferrer MA. (2003). Effect of salicylic acid on peroxidase activity from *Vitis* spp. *in vitro* cultures. En: *Plant Peroxidases. Biochemistry and Physiology*. Acosta M, Rodríguez-López N, Pedreño MA, ed. Universidad de Murcia, pp. 260-266
- Lanzani A, Bondioli P. (1994). New Short Path Distillation System Applied to the Reduction of Cholesterol in Butter and Lard. *JAOCs* 71: 609-614
- Lichtenthaler HK, Wellburn AR. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Trans.* 11: 591-592
- Liebler DC. (1998). Antioxidant chemistry of alpha-tocopherol in biological systems. Roles of redox cycles and metabolism. *Subcell. Biochem.* 30: 301–317
- Lingnert H, Vallentin K, Eriksson CE. (1979). Measurement of antioxidative effect in model system. *J Food Proc Pres* 3: 87-103
- López Arnaldos T; Muñoz R; Ferrer MA, Calderón AA. (2001). Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria x ananassa*, cv. Chandler) callus culture. *Physiol. Plant.* 113: 316-323
- Ly TN, Shimoyamada M, Yamauchi R. (2006). Isolation and characterization of rosmarinic acid oligomers in *Celastrus hindsii* Benth leaves and their antioxidative activities. *J. Agric. Food Chem.* 54: 3786-3793

- Madsen HL, Bertelsen G. (1995). Spices as antioxidants. *Trends Food Sci. Technol.* 6: 271-277
- Marigo G. (1973). Sur une méthode de fractionnement et d'estimation des composés phénoliques chez les végétaux. *Analisis* 2: 106–110
- Meyer AS, Donovan JL, Pearson DA, Waterhouse AL, Frankel EN. (1998). Fruit hydroxycinnamic acids inhibit human low-density lipoprotein oxidation *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.* 46: 1783-1787
- Miliauskas G, Venskutonis PR, van Beck TA. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem.* 85: 231-237
- Miller NJ, Rice-Evans CA, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci.* 84: 407-412
- Minibayeva F, Mika A, Lüthje S. (2003). Salicylic acid changed the properties of extracellular peroxidase activity secreted from wounded wheat (*Triticum avensis* L.) roots. *Protoplasma* 221: 67–72
- Mittler R, Vanderauwera S, Van Breusegem F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 10: 490-498
- Mittler R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7: 405-410
- Muklopadhyay M. (2000). *Natural Extracts Using Supercritical Carbon Dioxide*. CRC Press
- Murashige T, Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473–497
- Nakatani N, Inatani R, Konishi T. (1984) *Antioxidant Compound, Method of Extracting Same from Rosmary and Use of Same* US Pat. 4,450,097.
- Nobata Y, Urakaze M, Temaru R, Sato A, Nakamura N, Yamazaki K, Kishida M, Takata M, Kobayashi M. (2002). Alpha-tocopherol inhibits IL-8 synthesis induced by thrombin and high glucose in endothelial cells. *Horm. Metab. Res.* 34:49–54
- Noctor G, Foyer CH. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 249-2
- Noctor G, Gómez L, Vanacker H, Foyer CH. (2002). Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling. *J. Exp. Bot.* 53: 1283–1304
- Ooi CK, Y M, Choo SC, Yap, Y Basiron, Ong ASH. (1994). Recovery of carotenoids from Palm Oil. *JAOCs* 71: 423-426

- Oyaizu M. (1986). Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr.* 44: 307-315
- Padh H. (1990). Cellular functions of ascorbic acid. *Biochem Cell Biol.* 68: 1166-1173
- Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C. (2005). Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Rep.* 24: 255-265
- Pastori GM, Kiddle G, Antoniw J, Bernard S, Veljovic-Jovanovic S, Verrier PJ, Noctor G, Foyer CH. (2003). Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *Plant Cell* 15: 939-951
- Pietta PG. (2000). Flavonoids as antioxidant. *J. Nat. Prod.* 63: 1035-1042
- Potters G, Horemans N, Bellone S, Caubergs J, Trost P, Guisez Y, Asard H. (2004). Dehydroascorbate influences the plant cell cycle through a glutathione-independent reduction mechanism. *Plant Physiol.* 134: 1479–1487
- Prasad TK. (1996). Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities. *Plant J* 10:1017-1026
- Proestos C, Chorianopoulos N, Nychas GJE, Komaitis M. (2005). RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* 53: 1190-1195
- Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP, Murr DP, Watkins CB. (1997). Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂-metabolizing enzymes. *Plant Physiol.* 115: 137-149
- 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
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 2: 152–159
- Robards K, Prenzler PD, Tucker G, Swatsitang P, Glover W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* 66: 401-436
- Sakihama Y, Cohen MF, Grace SC, Yamasaki H. (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* 177: 67-80
- Sellappan S, Akoh CC, Krewer G. (2002). Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-Grown blueberries and blackberries. *J. Agric. Food Chem.* 50: 2432-2438

- Sharma MK, Buettner GR. (1993). Interaction of vitamin C and vitamin E during free radical stress in plasma: an ESR study. *Free Radic Biol. Med.* 14: 649-653
- Sharma YK, León J, Raskin I, Davis KR. (1996). Ozone-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: the role of salicylic acid in the accumulation of defense-related transcripts and induced resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5099-5104
- Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K. (2002). Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J. Exp. Bot.* 53: 1305–1319
- Sicilia F, Mattei B, Cervone F, Bellincampi D, De Lorenzo G. (2005). Characterization of a membrane-associated apoplastic lipoxygenase in *Phaseolus vulgaris* L. *Biochim. Biophys. Acta* 1748: 9–19
- Siddhuraju P, Becker K. (2007). The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. *Food Chem.* 101:10-19
- Smirnoff N, Wheeler GL. (2000). Ascorbic acid in plants: Biosynthesis and function. *Crit. Rev. Plant Sci.* 19: 267–290
- Smirnoff N. (2000). Ascorbic acid: metabolism and functions of a multifaceted molecule. *Curr Opin Plant Biol* 3: 229-235
- Sotomayor JA, Martínez Rosa M, Quiles M, García Moya AJ, Jordán MJ. (2004). Necesidad ecológica y posibilidades de cultivo del tomillo en la Región de Murcia. III Congreso de la Naturaleza de la Región de Murcia.
- Suhaj M. (2006). Spice antioxidant isolation and their antiradical activity: a review. *J. Food Comp. Anal.* 19: 531-537.
- Szabo E, Thelen A, Petersen M. (1999). Fungal elicitor preparations and methyl jasmonate enhance rosmarinic acid accumulation in suspension cultures of *Coleus blumei*. *Plant Cell Rep.* 18: 485–489
- Takahama U. (1998). Ascorbic acid-dependent regulation of redox levels of chlorogenic acid and its isomers in the apoplast of leaves of *Nicotiana tabacum* L. *Plant Cell Physiol.* 39: 681-689.
- Takahama U. (2004). Oxidation of vacuolar and apoplastic phenolic substrates by peroxidase: Physiological significance of the oxidation reactions. *Phytochemistry Rev.* 3: 207-219
- Tokunaga T, Miyahara K, Tabata K, Esaka M. (2005). Generation and properties of ascorbic acid-overproducing transgenic tobacco cells expressing sense RNA for L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase. *Planta* 220: 854–863

- Tomás F, Hernández L, Tomás-Barberán FA, Ferreres F. (1985). Flavonoid glycosides from *Thymus membranaceus*. *Z. Naturforsch. C* 40: 583-584
- USDA, ARS, National Genetic Resources Program. (2003). Phytochemical and Ethnobotanical Databases. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland
- Valenzuela A, Nieto S.(1995). Los antioxidantes: protectores de la Calidad en la Industria Alimentaria. *Aceites y Grasas*, 310-321
- Van den Berg H, Faulks R, Granado HF, Hirschberg J, Olmedilla B, Sandmann G, Southon S, Stahl W. (2000). The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. *J. Sci Food Agric.* 80: 880-912
- Vanacker H, Harbinson J, Carver TLW, Foyer CH. (1998). Antioxidant defenses of the apoplast. *Protoplasma* 205: 129-140
- Vaya J, Aviram, M. (2001). Nutritional antioxidants: Mechanisms of action, analyses of activities and medical applications. *Curr. Med. Chem.* 1:99-117
- Wen PF, Chen JY, Kong WF, Pan QH, Wan SB, Huang WD. (2005). Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry. *Plant Sci.* 169: 928-934
- Wiermann R. (1981). Secondary plant products and cell and tissue differentiation. En *The Biochemistry of Plants*, vol. 7, ed. E.E. Conn, Academic Press, pp. 85-116
- Wood J ,Senthilmohan, S , Peskin A. (2001). Antioxidant activity of procyanidin-containing plant extracts at different pHs. *Food Chemistry* (77) 155-161.
- Woodall AA, Lee SW, Weesie RJ, Jackson MJ, Britton G. (1997). Oxidation of carotenoids by free radicals: Relationship between structure and reactivity. *Biochem Biophys Acta* 1336: 33-42
- Yalpani N, Enyedi AJ, León J, Raskin I. (1994). Ultraviolet light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid and pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. *Planta* 193: 373-376
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. (2005). Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends Plant Sci.* 10: 88-94
- Yang Y, Qi M, Mei C. (2004). Endogenous salicylic acid protects rice plants from oxidative damage caused by aging as well as biotic and abiotic stress. *Plant J.* 40: 909-919
- Yildirim A, Mavi A, Oktay M, Kara AA, Algur OF, Bilaloglu V. (2000). Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of tilia (*Tilia argentea* Desf ex DC), sage (*Salvia triloba* L.), and black tea (*Camellia sinensis*) extracts. *J Agric Food Chem* 48: 5030-5034

Zhu K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 247–273

Páginas de Internet consultadas:

- www.dsalud.com/numero57_2.htm
- www.hipernatural.com/es/plttomillo.htm
- www.um.es/grupos/grupo-fitohormonas/index.htm.