

Katty Fierro troncoso

**EXTRACCI3N DE FENOLES Y FLAVONOIDES DEL T3 DE MURSALITSA
Y LA 3ORA**

TRABAJO DE FINAL DE GRADO

dirigido por el Dr. Bartosz Tylkwosky y por la Dra. Cristina Quintas P3rez

Grado de Qu3mica



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona

2016

ABSTRACT

In this assay, the phenols and flavonoids extraction from Mursalski tea (*Sideritis scardica Griseb*) and nora pepper (a variety of *Capsicum annuum*) have been studied. The extractions were carried out using two different methods, magnetic stirrer and ultrasounds. Ethanol and isopropanol were used as solvents.

High amounts of total phenols were obtained by using ethanol as solvent. An optimum treatment of sample as well as extraction methods and solvents were studied in relation to maximum yield. With regard to the extraction kinetics, magnetic stirrer was the fastest method due to the fact that during first hours majority of poliphenolics compounds were extracted.

Bearing in mind that extractions by magnetic stirrer are 24 hour long, whereas extractions by ultrasounds are 1 hour long, obtained results by ultrasound extraction are practically equivalent to results from magnetic stirrer extraction. Hence, considering the less time and energy invested by ultrasound extraction, we conclude that it is the optimum method to extract phenols and flavonoids from Mursalski tea and nora pepper.

INDICE

1. Introducción.....	1
2. Objetivo.....	3
3. Fundamento teórico.....	4
3.1. Polifenoles.....	4
3.1.1. Fenoles.....	6
3.1.2. Flavonoides.....	7
3.2. Extracción por agitación magnética.....	8
3.3. Extracción por ultrasonidos.....	8
3.4. Detección y cuantificación de polifenoles.....	
9	
3.4.1. Contenido de fenoles totales.....	9
3.4.2. Contenido de flavonoides totales.....	
9	
3.4.3. Espectrofotometría ultravioleta visible.....	9
3.5. ESEM (Environmental Scanning Electron Microscopy)	10
3.6. Ángulo de contacto.....	11
4. Experimentación.....	11
4.1. Reactivos.....	11
4.2. Muestras.....	12
4.2.1. Té de Mursalitsa.....	12
4.2.2. Ñora.....	12
4.3. Tratamiento de las muestras.....	13
4.4. Recta de calibrado.....	13
4.5. Extracciones.....	13

4.5.1. Agitación magnética.....	14
4.5.1.1. Estudio cinético.....	14
4.5.2. Ultrasonidos.....	14
4.6. Detección y cuantificación.....	15
4.6.1. Contenido de fenoles totales.....	15
4.6.2. Contenido de flavonoides totales.....	15
4.7. ESEM.....	16
4.8. Ángulo de contacto.....	16
5. Resultados y discusión.....	16
5.1. Rectas de calibrado.....	16
5.2. Absorbancia y concentración de fenoles.....	18
5.2.1. Té de Mursalitsa.....	18
5.2.2. Ñora.....	21
5.2.3. Ñora seca y triturada.....	23
5.3. Absorbancia y concentración de flavonoides.....	23
5.3.1. Té de Mursalitsa.....	23
5.3.2. Ñora.....	25
5.3.3. Ñora seca y triturada.....	27
5.4. ESEM.....	29
5.5. Ángulo de contacto.....	35
5.6. Optimización del método de extracción.....	36
6. Conclusiones.....	37
7. Bibliografía.....	38

1. Introducción

En los últimos años ha habido un incremento notable en la población en cuanto al interés de las propiedades innatas en sustancias naturales de origen vegetal. A causa de ello se ha promovido el estudio y la búsqueda de nuevas cualidades de esta clase de alimentos, las cuales se podrían llegar a potenciar aún más.

En alimentos de origen vegetal no solo se pueden obtener nutrientes (proteínas, carbohidratos, grasas, vitaminas y minerales), si no también otro tipo de sustancias, como pueden ser los fitoquímicos. Los fitoquímicos son sustancias químicas de origen exclusivamente vegetal presentes en algunas partes de las plantas, semillas, frutos y hojas. Sus principales funciones son las de actuar como metabolitos esenciales para el crecimiento y la reproducción de las plantas o su intervención como agentes protectores frente a patógenos.

Existen diferentes clases de fitoquímicos, agrupados por sus funciones y características físicas y químicas, como pueden ser los terpenos, tioles y polifenoles. Dentro de esta última clase, los polifenoles, encontramos diferentes subclases; ácidos fenólicos, flavonoides o amidas polifenólicas, entre otros.

Los compuestos polifenólicos están directamente relacionados con propiedades como el sabor y la dureza, así como diversas características nutritivas. También contribuyen a la pigmentación de algunos alimentos. La reacción de oxidación de los compuestos polifenólicos produce un oscurecimiento enzimático en los alimentos, fenómeno muy importante para asegurar la calidad de frutas y verduras durante el procesado.

Gran parte de estos compuestos polifenólicos actúan como inhibidores de las células tumorales, y pueden tener propiedades antimicrobianas, antioxidantes, antialérgicas, antiinflamatorias, anticolesterol o antivirales. En la industria alimentaria estos compuestos se añaden a ciertos alimentos, que luego se venden como alimentos funcionales.

Dada la importancia de estos compuestos, resulta interesante estudiar la concentración de polifenoles totales en diferentes alimentos de consumo habitual en nuestra sociedad, así como la forma más eficiente de extraerlos.

2. Objetivo

Los objetivos a llevar a cabo en este trabajo final de grado son:

- Comprobar la existencia de fenoles y flavonoides en la ñora, ingrediente común en la gastronomía de Cataluña.
- Definir la cinética de extracción de los compuestos polifenólicos en el té de Mursalitsa y la ñora en diferentes solventes.
- Determinar la extractabilidad, en diferentes solventes y por diferentes métodos, de los fenoles y flavonoides del té de Mursalitsa y de la ñora.

3. Fundamento teórico

3.1. Polifenoles

Los compuestos polifenólicos son una de las principales clases de metabolitos secundarios de las plantas. Tienen una estructura química que se caracteriza por la presencia de un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos. Los polifenoles pueden tener diversos roles en la naturaleza. Algunos tienen la función de defensa de herbívoros y patógenos, debido a sus efectos tóxicos y antinutricionales. También pueden actuar como fuentes de atracciones hacia los polinizadores; otros pueden inhibir el crecimiento de las plantas que viven cerca y algunos tienen la función de soporte mecánico para las plantas. ^[1]

Asimismo, contribuyen al color de las frutas y verduras, siendo responsables del oscurecimiento enzimático que se produce durante el pelado y troceado de ciertos vegetales el cual ayuda a certificar la calidad del alimento.

Investigaciones recientes han demostrado el potencial antioxidante de los polifenoles en los alimentos. Numerosos estudios epidemiológicos han indicado que los alimentos y bebidas ricos en polifenoles son un factor importante en la prevención de enfermedades, la disminución de enfermedades cardiovasculares y neoplásicas, y en la ralentización de los procesos de envejecimiento.

Pueden actuar como antioxidantes, protegiendo a diversos componentes de las plantas contra la oxidación. Este efecto antioxidante puede también inhibir la síntesis de nitrosaminas (agentes cancerígenos), que se producen durante la cocción o la digestión de alimentos cárnicos que llevan nitritos o nitratos como conservantes, así como de alimentos vegetales que contienen nitritos y nitratos procedentes de abono natural. ^[2]

Algunas propiedades organolépticas de los alimentos como el color, el sabor y la amargura están estrechamente relacionadas con la compo-

sición fenólica inicial. También está conectado a los factores ambientales tales como la temperatura, la luz y el pH.

Se han descrito más de 8000 polifenoles distintos que pueden clasificarse en diferentes grupos en función del número de anillos fenólicos que con-tienen y el tipo de sustituyente unido a estos anillos.

La clasificación de los polifenoles de acuerdo con sus diferentes estructuras químicas se puede ver en la Figura 1.

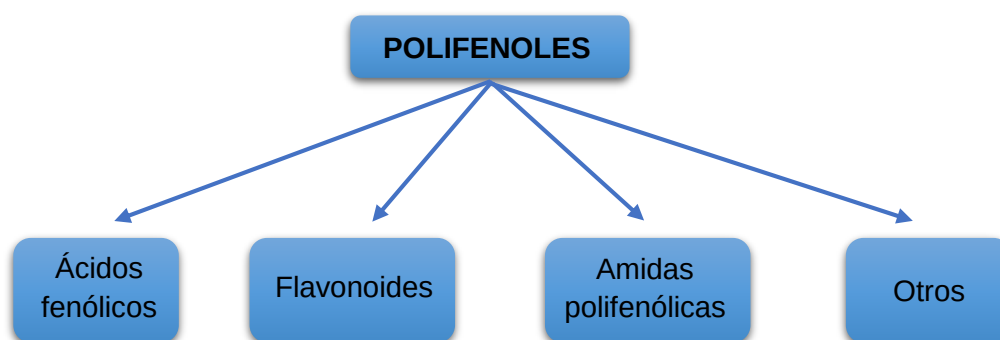


Figura 1. Clasificación de polifenoles

La estructura química de los polifenoles también afecta a sus propiedades biológicas tales como la biodisponibilidad, actividad antioxidante, e interacciones específicas con receptores y enzimas de las células entre otras propiedades.

- Estructura y propiedades fisicoquímicas

Los polifenoles comprenden una amplia variedad de moléculas que incluyen desde compuestos altamente polimerizados hasta moléculas simples con un solo anillo fenólico en su estructura, como los alcoholes y ácidos fenólicos.

Se pueden distinguir por las siguientes características:

- Solubilidad en agua. Aunque algunos polifenoles pueden ser escasamente solubles en agua, la mayoría de ellos son moderadamente solubles en agua.

- Peso molecular. Los polifenoles naturales abarcan un amplio rango de pesos moleculares comprendido entre 500 y 4000 Da.
- Estructura y carácter polifenólico Los polifenoles, por cada 1000 unidades de masa molecular relativa, poseen unos 12 - 16 grupos fenólicos y de 5 a 7 anillos aromáticos.
- Con 5-7 anillos aromáticos por 1000 Da. [3]

3.1.1. Fenoles

Los fenoles o ácidos fenólicos son compuestos polifenólicos no flavonoides que se pueden dividir en dos tipos principales, ácidos benzoicos y derivados del ácido cinámico (Figura 2). Si bien las frutas y las verduras contienen muchos ácidos fenólicos libres, en granos y semillas, particularmente en el salvado o en la cascara, los ácidos fenólicos están comúnmente en su forma ligada. Estos ácidos fenólicos sólo pueden ser liberados o hidrolizados a través de hidrólisis ácida o alcalina, o por enzimas. [4]

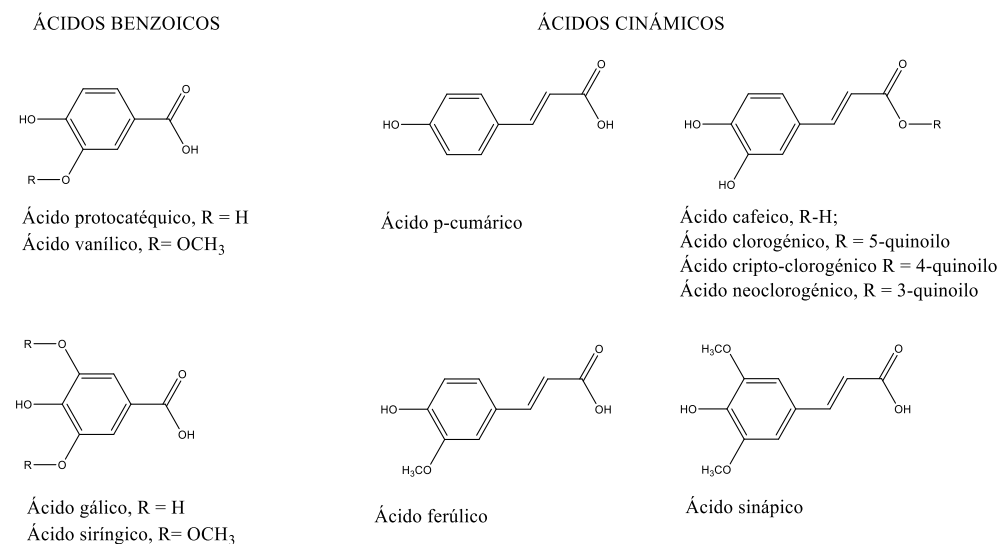


Figura 2. Clases de fenoles.

3.1.2. Flavonoides

La palabra flavonoide proviene del latín “Flavus” que significa amarillo, aunque se encuentra una amplia gama de colores que van desde el rojo hasta el azul. [5]

Son compuestos naturales presentes en el reino vegetal. En la actualidad se conocen alrededor de 4000 tipos.

Las partes de la planta más ricas en estas sustancias son las flores, las frutas, las cortezas, las semillas y las raíces.

Los flavonoides abundan en muchas plantas destinadas a uso alimentario, en frutas, verduras, legumbres y algunas bebidas y vino. Con la dieta se asume una cantidad de entre 26 miligramos y 1 gramo al día. Esta variabilidad depende del estado de madurez de la fruta, los hábitos alimenticios y el modo de preparación y almacenamiento de alimentos (calor, luz, etc.).

Los flavonoides (Figura 3) tienen la columna vertebral estructural general C6-C3-C6 en la que las dos unidades son de naturaleza fenólica. Se pueden dividir en diferentes subgrupos tales como chalconas, isoflavonas, neoflavonoides, entre otros. [4]

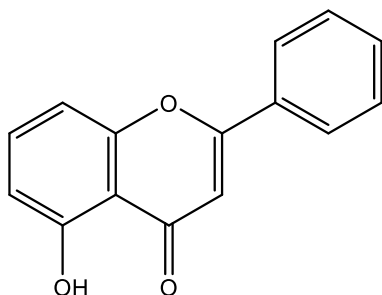


Figura 3. Estructura básica de los flavonoides.

3.2. Extracción por agitación magnética

La extracción por agitación magnética es un método de extracción sólido-líquido donde se utiliza una barra magnética, comúnmente cubierta por una capa de teflón, y un agitador magnético, el cual utiliza un campo magnético para mezclar de manera automatizada un solvente y uno o más solutos.

La barra magnética se deja deslizar dentro de un contenedor, ya sea un matraz o un vaso de precipitado que contiene el solvente. El contenedor es puesto encima de la placa donde el campo magnético rotatorio ejerce su influencia sobre la barra de agitación y propicia su rotación.

El tamaño y la forma de la barra magnética determinan la efectividad del proceso de agitación considerando una velocidad constante. [6]

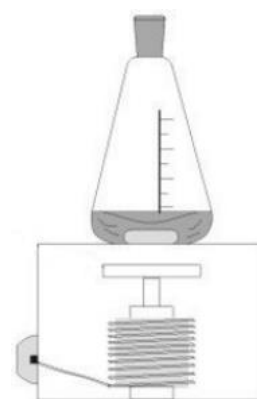


Figura 4. Agitador magnético

3.3. Extracción por ultrasonidos

Ultrasonidos es el nombre designado a cualquier onda de sonido cuya frecuencia sea superior a 20 kHz, que es la frecuencia más alta capaz de captar el oído humano.

La extracción asistida por ultrasonido utiliza sonidos de alta frecuencia, con el fin de desprender el compuesto buscado del material. Las partículas sólidas y líquidas vibran y se aceleran ante la acción ultrasónica. Como resultado el soluto pasa rápidamente de la fase sólida al solvente.

Las frecuencias utilizadas en la práctica pueden llegar, incluso, a los gigahercios. En cuanto a las longitudes de onda, éstas son del orden de centímetros para frecuencias bajas y del orden de micras para altas frecuencias. [7]

3.4. Detección y cuantificación de polifenoles

3.4.1. Contenido de fenoles totales

El contenido de fenoles totales se determinó mediante el método Folin-Ciocalteu ^[8] el cual se basa en un cambio colorimétrico debido a una reacción de oxidación-reducción. El reactivo Folin-Ciocalteu contiene una mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico que, al reaccionar con los compuestos fenólicos presentes, forman complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico. En medio básico estos complejos se reducen a óxidos de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), sustancias de un color azul intenso que son proporcionales a la cantidad de grupos fenólicos presentes en la muestra.

3.4.2. Contenido de flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales se determinó mediante la adición de $AlCl_3$ ^[9]. En presencia de compuestos flavonoides que contienen grupos hidroxilos se forman complejos estables de aluminio-flavonoide. Estos complejos son de un color amarillento y son proporcionales a la cantidad grupos flavonoides presentes en la muestra.

3.4.3. Espectrofotometría ultravioleta visible

La espectrofotometría ultravioleta-visible o UV-Vis es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones, entre ellas las que están dentro del espectro UV-visible.

Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro, el cual mide la intensidad de luz que pasa a través de una muestra y en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa a través de una solución. ^[10]

3.5. ESEM

El ESEM (Environmental Scanning Electron Microscopy) o microscopio electrónico de barrido ambiental, es un microscopio electrónico de barrido (SEM) que permite recoger micrografías electrónicas de las muestras. La resolución proporcionada por esta técnica es más alta que la microscopía óptica convencional, pero inferior al SEM. La principal ventaja de la técnica es la preparación mínima de la muestra necesaria, por lo que es más rápido de usar. A diferencia de un microscopio electrónico de barrido típico, permite analizar muestras biológicas o de aislamiento no metalizadas y muestras húmedas o líquidas



Figura 5. ESEM

El ESEM se compone de; una columna de electrones, la cual crea un haz de electrones; una cámara de la muestra, donde el haz de electrones interactúa con la muestra; detectores, que controlan las señales resultantes de las interacciones del haz de electrones con la muestra; y un sistema de visualizaciones, que construye una imagen de la señal. Una pistola de electrones en la parte superior de la columna genera el haz de electrones. En la pistola, un campo electrostático dirige los electrones, emitidos desde una región muy pequeña en la superficie de un electrodo, a través de un punto llamado cruce. A continuación, la pistola acelera los electrones por la columna hacia la muestra, con energías que van desde unos pocos cientos, a decenas de miles de voltios de electrones. ^[11]

3.6. Ángulo de contacto

El ángulo de contacto se puede definir como el ángulo que forma una gota de líquido al entrar en contacto con un sólido. La medida y el valor de este ángulo indica el grado afinidad que tiene el sustrato con líquido.

El ángulo de contacto será aproximadamente de 0° cuando el líquido es atraído fuertemente por el sólido. En casos donde el sólido sea menos afín, el ángulo de contacto puede estar entre los 0° y 30° . Cuando esta afinidad del sólido por el líquido va disminuyendo, el ángulo de contacto va aumentando; 90° , 150° , incluso puede llegar a valores cercanos a 180° .^[12]



Figura 6. Ángulo de contacto

4. Experimentación

4.1. Reactivos

- Etanol 96% v/v extra puro, Scharlau
- 2-propanol, 99,5% v/v, Scharlau
- Ácido gálico 97,5-102,5% (titration), Sigma-Aldrich
- Quercetin dihydrate, 97%, Alfa Aesar
- Cloruro de aluminio, Sigma-Aldrich
- Carbonato de sodio, 99,95%, extra puro, anhidro, Acros Organic
- Folin-Ciocalteu phenol reagent, Sigma-Aldrich
- Agua milli-Q

4.2. Muestras

4.2.1. Té de Mursalitsa

El té mursalita, *Sideritis scardica* Griseb. (Género *Sideritis*, familia Lamiaceae) es una planta endémica de la península de los Balcanes. Es ampliamente utilizado en la



Figura 7. Té de Mursalitsa

medicina popular debido a sus propiedades antiinflamatorias y antireumáticos. Además, se utiliza para el tratamiento de la tos, trastornos gastrointestinales, y también para combatir la bronquitis, el asma bronquial, el resfriado común, el enfisema pulmonar y como un componente activo de los suplementos dietéticos para la prevención de la anemia.

El estudio de la composición química de los extractos de *Sideritis* spp. ha demostrado la importancia del contenido de compuestos polifenólicos para su actividad biológica. [13]

En este trabajo se utilizó el té de Mursalitsa de la marca TOHUKA de Bulgaria.

4.2.2. Ñora

La ñora es una variedad de *Capsicum annuum* o pimiento, denominado bola, secado al sol. Es un ingrediente muy utilizado en la gastronomía de Cataluña, la Comunidad Valenciana y la Región de Murcia. Tiene un tamaño pequeño, forma redonda y es de color rojo.



Figura 8. Ñora

En Cataluña se utiliza también en sofritos y arroces, pero sobre todo es el ingrediente principal y característico de la salsa romesco, esencial para cualquier *calçotada*. [14]

En este trabajo se utilizó ñora de la marca Hacendado de España.

4.3. Tratamiento de las muestras

- Té de Mursalitsa: Fue cortado de la forma más homogénea posible
- Ñora: inicialmente fue cortada de la forma más homogénea posible, posteriormente se secó en la estufa durante 72h y a continuación fue triturada con Braun MQ 745 Aperitif Multiquick 7 - Minipimer.

4.4. Recta de calibrado

- **Recta de calibrado del ácido gálico**

Siguiendo la bibliografía ^[15] esta recta de calibrado se hizo a partir de patrones a diferentes concentraciones (0,03-0,25 mg/ml) de ácido gálico y utilizando etanol como disolvente. Con esta recta se pueden calcular los fenoles totales de las muestras.

- **Recta de calibrado de quercetin**

Siguiendo la bibliografía ^[15] esta recta de calibrado se hizo a partir de patrones a diferentes concentraciones (0,005-0,1 mg/ml) de quercetin y utilizando etanol como disolvente. Con esta recta se pueden calcular los flavonoides totales de las muestras.

4.5. Extracciones

Se realizaron diferentes extracciones con proporción 1:15 (g/ml) ^[16]. Las extracciones se hicieron con dos solventes diferentes; etanol e isopropanol. El etanol fue escogido por referencias bibliográficas ^[15,17] en las cuales ya se había utilizado como solvente en esta clase de extracción, con resultados óptimos. El isopropanol en cambio fue escogido debido a que estas extracciones serán concentradas mediante membranas de nanofiltración que fueron caracterizadas previamente con estos solventes.

4.5.1. Agitación magnética

Los fenoles y flavonoides existentes en el té de Mursalitsa y la ñora se extrajeron, con los respectivos solventes, mediante agitación magnética durante 24h. También se llevaron a cabo experimentos de extracción de 1h con un aumento de temperatura, hasta una T^a final de 50°C. Estos últimos se hicieron para comparar con los experimentos de extracción por ultrasonidos que se realizaron posteriormente. Se utilizó un Erlenmeyer con un diámetro 6,7 cm y una barra magnética de 3,8 cm de largo.

4.5.1.1. Estudio cinético

Con el objetivo de hacer un estudio cinético de la extracción mediante agitación magnética, se tomaron diferentes muestras de las extracciones cada hora durante las primeras seis horas.

4.5.2. Ultrasonidos

Los fenoles y flavonoides existentes en el té de Mursalitsa y la ñora se extrajeron, con los respectivos solventes, mediante el uso de ultrasonidos durante 1h (*Baño de limpieza "Ultrasons" sin calefacción, Selecta*).

Se comprobó el incremento de temperatura, cada 15 minutos, durante la hora de extracción, y se observó un aumento en la temperatura hasta los 50°C.

Tabla 1. Incremento de temperatura durante la extracción por ultrasonidos.

Tiempo (min)	Temperatura (°C)
0	19
15	36
30	43
45	47
60	50

4.6. Detección y cuantificación

Finalizadas todas las extracciones se llevó a cabo una separación de fases mediante una filtración por gravedad. La fase líquida se utilizó para realizar los diferentes procedimientos, con tal de poder detectar y cuantificar los fenoles y flavonoides extraídos del té de Mursalitsa y de la ñora. El sólido obtenido se dejó secar a temperatura ambiente durante tres días. Se utilizó el espectrofotómetro *UV-VIS Spectronic Genesys 5* para medir las absorbancias correspondientes.

4.6.1. Contenido de fenoles totales

El contenido de fenoles totales se determinó espectrofotométricamente siguiendo el método Folin-Ciocalteu, donde a 0,5 ml de la muestra extraída se le añadieron 0,5 ml del reactivo Folin-Ciocalteu y 10 ml de agua. Al cabo de 5 minutos se le añadieron 8 ml de una solución de Na_2CO_3 (7,5%). Las muestras se guardaron en la oscuridad durante 2h y a continuación se realizaron 3 mediciones de absorbancia a cada muestra a una longitud de onda de 765 nm. ^[15]

4.6.2. Contenido de flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales se determinó espectrofotométricamente siguiendo el método Ordoñez, donde a 0,5 ml de la muestra extraída se le añadieron 0,5 ml de una solución, de etanol o isopropanol dependiendo del solvente utilizado para realizar la extracción, al 2% de AlCl_3 . Las muestras se guardaron en la oscuridad durante 1h y a continuación se realizaron 2 mediciones de absorbancia a cada muestra a una longitud de onda de 420 nm. ^[18]

4.7. ESEM

Las muestras solidas obtenidas, antes y después de la extracción, con los diferentes solventes, se llevaron al ESEM con el objetivo de ver microscópicamente el efecto que había tenido en su estructura la extracción con los diferentes métodos.

4.8. Ángulo de contacto

Tanto a las muestras de té de Mursalitsa como la ñora se les realizo un estudio del ángulo de contacto con los dos solventes utilizados en este trabajo. El instrumento utilizado fue el *OCA 15 EC sistema de video con medición automática*, donde analizaron secciones de las diferentes muestras y se usaron gotas de 5 µl del solvente correspondiente. En el caso de la ñora, el estudio se hizo tanto en la parte externa como la interna.

5. Resultados y discusión

5.1. Rectas de calibrado

- **Recta de calibrado del ácido gálico**

A partir de los patrones preparados previamente a diferentes concentraciones, se midieron sus respectivas absorbancias (Tabla 2) y se obtuvo la recta de calibrado correspondiente (Figura 8)

Tabla 2. Concentración, absorbancia y error de los patrones de ácido gálico.

Concentración (mg/ml)	Absorbancia media	Error
0,000	0,000	0,000
0,030	0,119	0,002
0,050	0,143	0,000
0,100	0,277	0,002
0,150	0,461	0,002
0,200	0,568	0,002
0,250	0,623	0,002

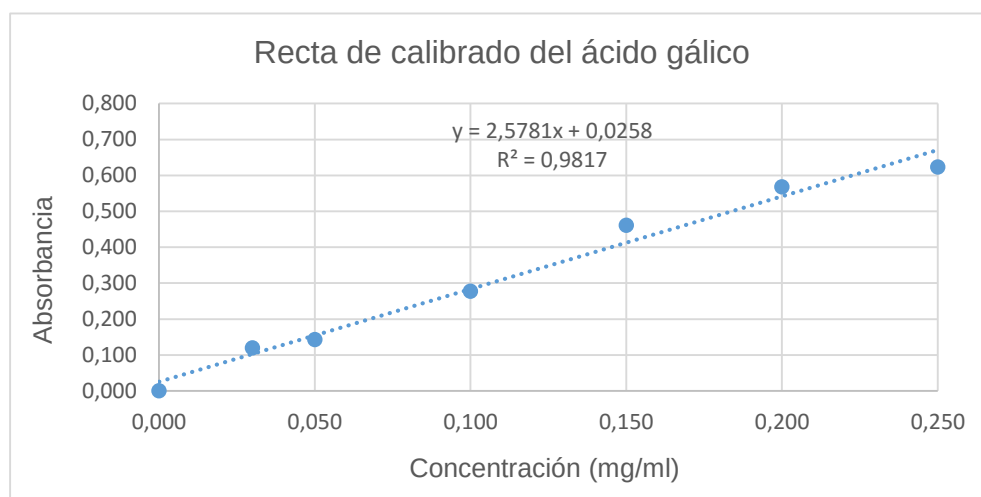


Figura 9. Recta de calibrado de ácido gálico.

- **Recta de calibrado de quercetin**

A partir de los patrones preparados previamente a diferentes concentraciones, se midieron sus respectivas absorbancias (Tabla 3) y se obtuvo la recta de calibrado correspondiente (Figura 9)

Tabla 3. Concentración, absorbancia y error de los patrones de quercetin.

Concentración (mg/ml)	Absorbancia media	Error
0,000	0,000	0,000
0,005	0,180	0,002
0,010	0,358	0,001
0,030	0,895	0,008
0,050	1,728	0,006
0,070	2,14	0,02
0,090	2,46	0,06
0,100	2,74	0,01

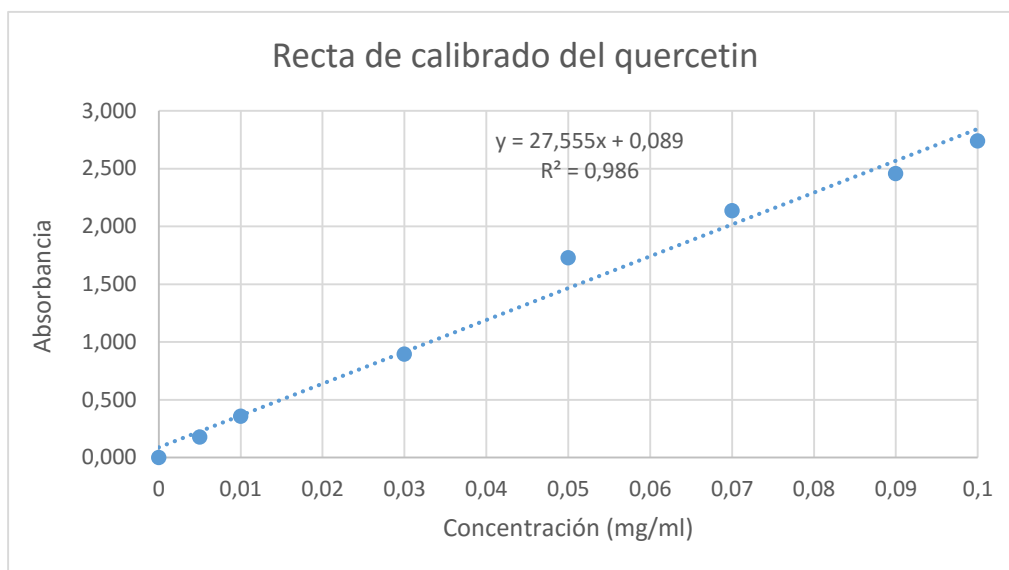


Figura 10. Recta de calibrado de quercetin.

5.2. Absorbancia y concentración de fenoles

A partir de la recta de calibrado de ácido gálico se ha determinado la concentración de fenoles. Los resultados obtenidos se encuentran enmarcados en este punto.

5.2.1. Té de Mursalitsa

En el caso de la extracción del té de Mursalitsa se diluyó 10 veces la muestra, debido a que era necesario que el solvente cubriese toda la muestra durante la extracción. De esta manera, las absorbancias obtenidas son respecto a la muestra diluida. En el momento de calcular la concentración se tiene en cuenta esta dilución.

- **Extracción por agitación magnética 24h**

Tabla 4. Tiempo, Absorbancia media, concentración (mg) y error de las concentraciones de la extracción del té de Mursalitsa, 24h, con etanol.

Tiempo (h)	Absorbancia media	Concentración media (mg)	Error de las concentraciones
0	0	0	0
1	0,101	4,36	0,09
2	0,121	5,5	0,2
3	0,141	6,70	0,06
4	0,160	7,8	0,1
5	0,121	5,5	0,2
6	0,174	8,6	0,2
24	0,235	12,15	0,03

Tabla 5. Tiempo, Absorbancia media, concentración (mg) y error de las concentraciones de la extracción del té de Mursalitsa, 24h, con isopropanol.

Tiempo (h)	Absorbancia media	Concentración media (mg)	Error de las concentraciones
0	0	0	0
1	0,128	5,93	0,03
2	0,142	6,74	0,03
3	0,137	6,47	0,06
4	0,140	6,65	0,06
5	0,153	7,4	0,1
6	0,155	7,5	0,1
24	0,196	9,89	0,07

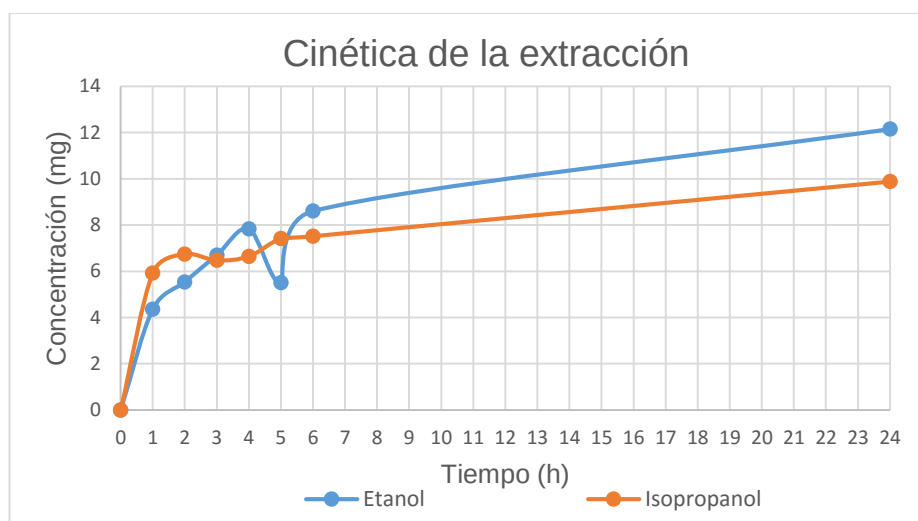


Figura 11. Cinética de la extracción por agitación magnética de fenoles del té de Mursalitsa.

Si nos fijamos en los resultados y en el gráfico de la Figura 10, podemos ver que durante las primeras 2 horas de extracción ya se habían extraído más del 50% de fenoles cuando se utilizó isopropanol como disolvente, en cambio no fue así hasta las 3 horas cuando el disolvente fue el etanol.

- **Extracción por agitación magnética 1h (T° final 50°C)**

Tabla 6. Absorbancia media, concentración (mg) y error de la concentración de la extracción del té de Mursalitsa 1h.

	Tiempo (h)	Absorbancia media	Concentración media (mg)	Error de la concentración
Etanol	1	0,163	8,00	0,03
Isopropanol	1	0,096	4,09	0,06

- **Extracción por ultrasonidos 1h**

Tabla 7. Absorbancia media, concentración (mg) y error de la concentración de la extracción del té de Mursalitsa 1h.

	Tiempo (h)	Absorbancia media	Concentración media (mg)	Error de la concentración
Etanol	1	0,188	9,4	0,2
Isopropanol	1	0,168	8,28	0,06

5.2.2. Ñora

- **Extracción por agitación magnética 24h**

Tabla 8. Tiempo, Absorbancia media, concentración (mg) y error de las concentraciones de la extracción de la ñora, 24h, con etanol.

Tiempo (h)	Absorbancia media	Concentración media (mg)	Error de las concentraciones
0	0	0	0
1	0,200	1,01	0,03
2	0,270	1,42	0,01
3	0,311	1,66	0,01
4	0,299	1,588	0,007
5	0,307	1,638	0,009
6	0,307	1,638	0,009
24	0,459	2,52	0,02

Tabla 9. Tiempo, Absorbancia media, concentración (mg) y error de las concentraciones de la extracción de la ñora, 24h, con isopropanol.

Tiempo (h)	Absorbancia media	Concentración media (mg)	Error de las concentraciones
0	0	0	0
1	0,164	0,804	0,006
2	0,166	0,82	0,01
3	0,176	0,876	0,007
4	0,200	1,012	0,009
5	0,209	1,066	0,006
6	0,227	1,17	0,02
24	0,310	1,65	0,01

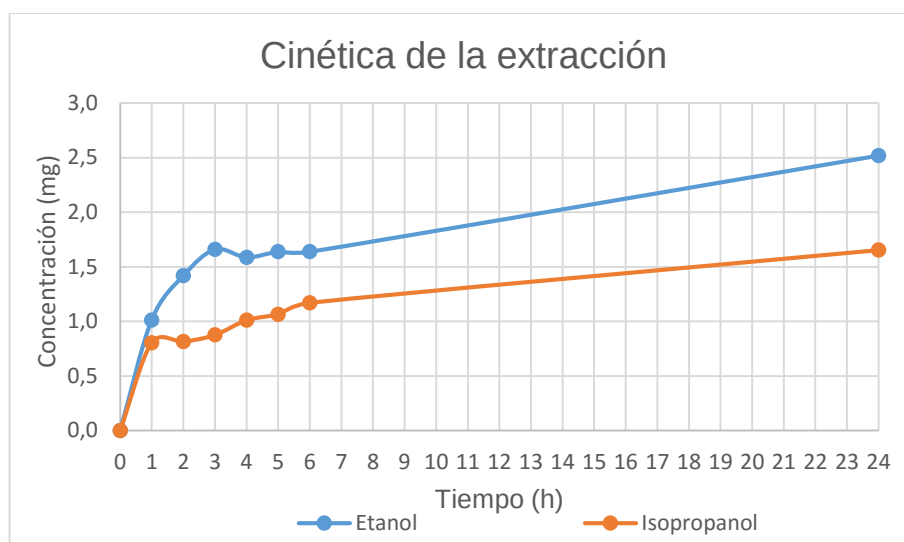


Figura 12. Cinética de la extracción por agitación magnética de fenoles de la ñora.

Como en el caso del té de Mursalitsa, en la extracción de la ñora podemos ver que la cantidad de fenoles es más elevada cuando utilizamos etanol como disolvente. Se puede ver que durante las primeras 3 horas de extracción ya se habían extraído más del 50% de fenoles en ambos casos.

- **Extracción por agitación magnética 1h (T° final 50°C)**

Tabla 10. Absorbancia media, concentración (mg) y error de la concentración de la extracción de la ñora 1h.

	Tiempo (h)	Absorbancia media	Concentración media (mg)	Error de la concentración
Etanol	1	0,302	1,61	0,02
Isopropanol	1	0,153	0,740	0,000

- **Extracción por ultrasonidos 1h**

Tabla 11. Absorbancia media, concentración (mg) y error de la concentración de la extracción de la ñora 1h.

	Tiempo (h)	Absorbancia media	Concentración media (mg)	Error de la concentración
Etanol	1	0,243	1,264	0,006
Isopropanol	1	0,178	0,88	0,03

5.2.3. Ñora seca y triturada

- **Extracción por agitación magnética 24h**

Tabla 12. Absorbancia media, concentración (mg) y error de la concentración de la extracción de la ñora 24h.

	Tiempo (h)	Absorbancia media	Concentración media (mg)	Error de la concentración
Etanol	24	0,506	2,792	0,009
Isopropanol	24	0,437	2,393	0,006

- **Extracción por ultrasonidos 1h**

Tabla 13. Absorbancia media, concentración (mg) y error de la concentración de la extracción de la ñora 1h.

	Tiempo (h)	Absorbancia media	Concentración media (mg)	Error de la concentración
Etanol	1	0,468	2,571	0,007
Isopropanol	1	0,308	1,640	0,007

5.3. Absorbancia y concentración de flavonoides

A partir de la recta de calibrado de quercetin se ha determinado la concentración de flavonoides. Los resultados obtenidos se encuentran enmarcados en este punto.

5.3.1. Té de Mursalitsa

Al igual que en el análisis de los fenoles, también fue necesario hacer una dilución de la muestra, la cual se diluyó 10 veces. Debido a ello, las absorbancias obtenidas son respecto a la muestra diluida. En el momento de calcular la concentración se tiene en cuenta esta dilución.

- **Extracción por agitación magnética 24h**

Tabla 14. Tiempo, Absorbancia media, concentración (mg) y error de las concentraciones de la extracción del té de Mursalitsa, 24h, con etanol.

Tiempo (h)	Absorbancia media	Concentración media (mg)	Error de las concentraciones
0	0	0	0
1	0,394	1,66	0,03
2	0,412	1,758	0,008
3	0,443	1,92	0,01
4	0,485	2,153	0,004
5	0,514	2,31	0,02
6	0,534	2,419	0,004
24	0,763	3,66	0,06

Tabla 15. Tiempo, Absorbancia media, concentración (mg) y error de las concentraciones de la extracción del té de Mursalitsa, 24h, con isopropanol.

Tiempo (h)	Absorbancia media	Concentración media (mg)	Error de las concentraciones
0	0	0	0
1	0,130	0,223	0,000
2	0,151	0,337	0,008
3	0,175	0,47	0,02
4	0,201	0,609	0,008
5	0,239	0,814	0,058
6	0,245	0,846	0,004
24	0,395	1,666	0,008

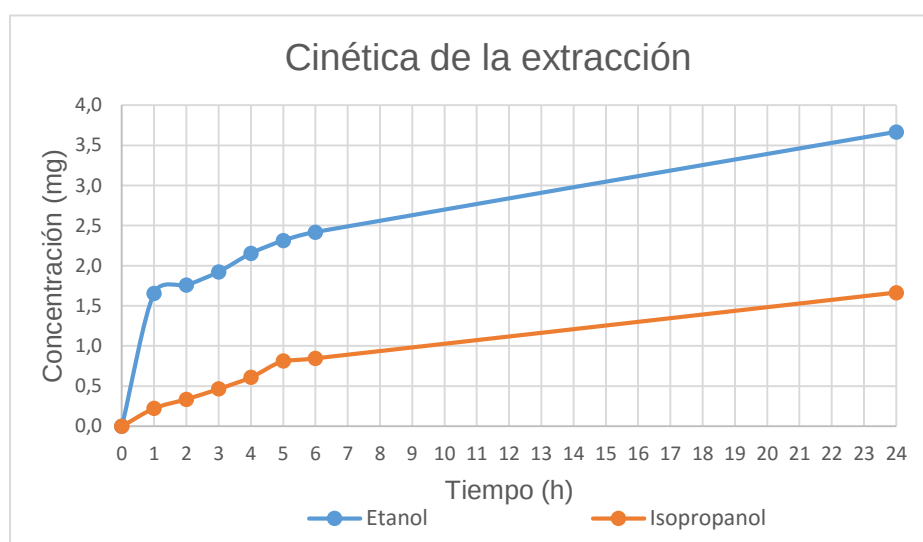


Figura 13. Cinética de la extracción por agitación magnética de flavonoides del té de Mursalitsa.

Si observamos los datos obtenidos y el gráfico de la Figura 12, se puede ver que durante las primeras 3 h ya se habían extraído más del 50% de flavonoides si se utilizaba etanol como disolvente, el cual obtiene un mejor resultado final. Por otro lado, el uso de isopropanol como disolvente no logró este porcentaje hasta las 5 h de extracción.

- **Extracción por agitación magnética 1h (T° final 50°C)**

Tabla 16. Absorbancia media, concentración (mg) y error de la concentración de la extracción del té de Mursalitsa 1h.

	Tiempo (h)	Absorbancia media	Concentración media (mg)	Error de la concentración
Etanol	1	0,574	2,643	0,004
Isopropanol	1	0,426	1,837	0,004

- **Extracción por ultrasonidos 1h**

Tabla 17. Absorbancia media, concentración (mg) y error de la concentración de la extracción del té de Mursalitsa 1h.

	Tiempo (h)	Absorbancia media	Concentración media (mg)	Error de la concentración
Etanol	1	0,656	3,086	0,008
Isopropanol	1	0,364	1,497	0,000

5.3.2. Ñora

En este caso, se diluyó 4 veces la muestra, debido a la elevada cantidad de flavonoides que había en estas, las cuales el espectrofotómetro no podía cuantificar si no se diluía la muestra. Con lo cual, las absorbancias obtenidas son respecto a la muestra diluida. En el momento de calcular la concentración se tiene en cuenta esta dilución.

- **Extracción por agitación magnética 24h**

Tabla 18. Tiempo, Absorbancia media, concentración (mg) y error de las concentraciones de la extracción de la ñora, 24h, con etanol.

Tiempo (h)	Absorbancia media	Concentración media (mg)	Error de las concentraciones
0	0	0	0
1	0,618	1,151	0,008
2	0,737	1,41	0,01
3	0,863	1,685	0,006
4	0,958	1,89	0,03
5	1,006	2,00	0,02
6	1,090	2,180	0,003
24	1,621	3,336	0,009

Tabla 19. Tiempo, Absorbancia media, concentración (mg) y error de las concentraciones de la extracción de la ñora, 24h, con isopropanol.

Tiempo (h)	Absorbancia media	Concentración media (mg)	Error de las concentraciones
0	0	0	0
1	0,331	0,527	0,00
2	0,398	0,67	0,01
3	0,459	0,804	0,002
4	0,498	0,889	0,005
5	0,568	1,042	0,005
6	0,647	1,214	0,008
24	1,311	2,660	0,005

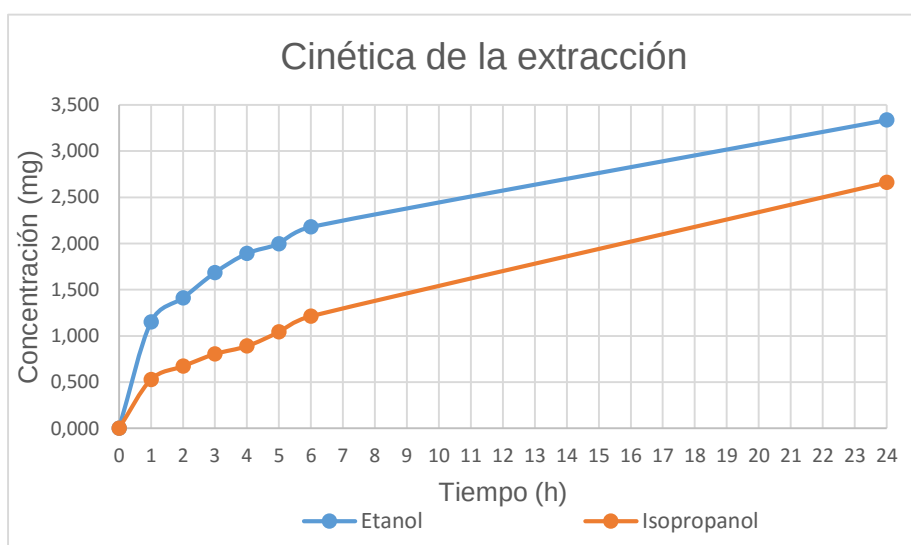


Figura 14. Cinética de la extracción por agitación magnética de flavonoides de la ñora.

Viendo los resultados y el grafico de la Figura 13, podemos ver que durante las primeras 3 horas de extracción ya se habían extraído más del 50% de flavonoides si se utilizaba etanol como disolvente, en cambio utilizando isopropanol no se logró este porcentaje hasta pasadas las 7 horas de extracción.

- **Extracción por agitación magnética 1h (T° final 50°C)**

Tabla 20. Absorbancia media, concentración (mg) y error de la concentración de la extracción de la ñora 1h.

	Tiempo (h)	Absorbancia media	Concentración media (mg)	Error de la concentración
Etanol	1	0,885	1,732	0,008
Isopropanol	1	0,563	1,032	0,009

- **Extracción por ultrasonidos 1h**

Tabla 21. Absorbancia media, concentración (mg) y error de la concentración de la extracción de la ñora 1h.

	Tiempo (h)	Absorbancia media	Concentración media (mg)	Error de la concentración
Etanol	1	0,711	1,353	0,002
Isopropanol	1	0,367	0,604	0,008

5.3.3. Ñora seca y triturada

- **Extracción por agitación magnética 24h**

Tabla 22. Absorbancia media, concentración (mg) y error de la concentración de la extracción de la ñora 1h.

	Tiempo (h)	Absorbancia media	Concentración media (mg)	Error de la concentración
Etanol	24	1,934	3,823	0,000
Isopropanol	24	2,052	4,080	0,006

- **Extracción por ultrasonidos 1h**

Tabla 23. Absorbancia media, concentración (mg) y error de la concentración de la extracción de la ñora 1h.

	Tiempo (h)	Absorbancia media	Concentración media (mg)	Error de la concentración
Etanol	1	1,542	2,97	0,01
Isopropanol	1	1,354	2,560	0,006

En término global, los mejores resultados de extracción son los obtenidos por agitación magnética 24h. Por otro lado, se debe tener en cuenta que la extracción con ultrasonidos 1h obtiene una cantidad de fenoles casi comparable. En base a los resultados, el ahorro de tiempo y el consiguiente ahorro en gasto energético se considera el método de extracción por ultrasonidos como la mejor opción.

Si se comparan los resultados de las extracciones de 1h, en las diferentes condiciones, se puede ver que los mejores resultados obtenidos son utilizando el ultrasonido como método de extracción, y etanol como disolvente.

5.4. ESEM

- Té de Mursalitsa

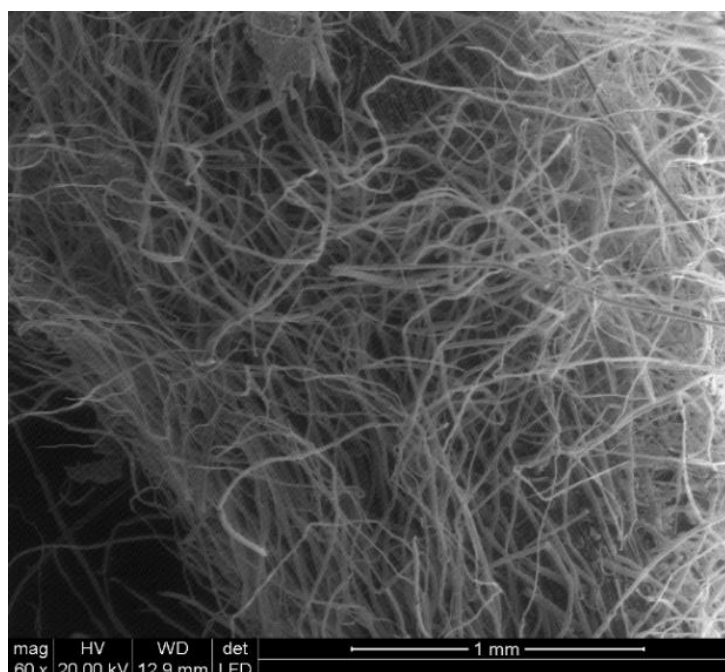


Figura 15. Micrografía ESEM del té de Mursalitsa.

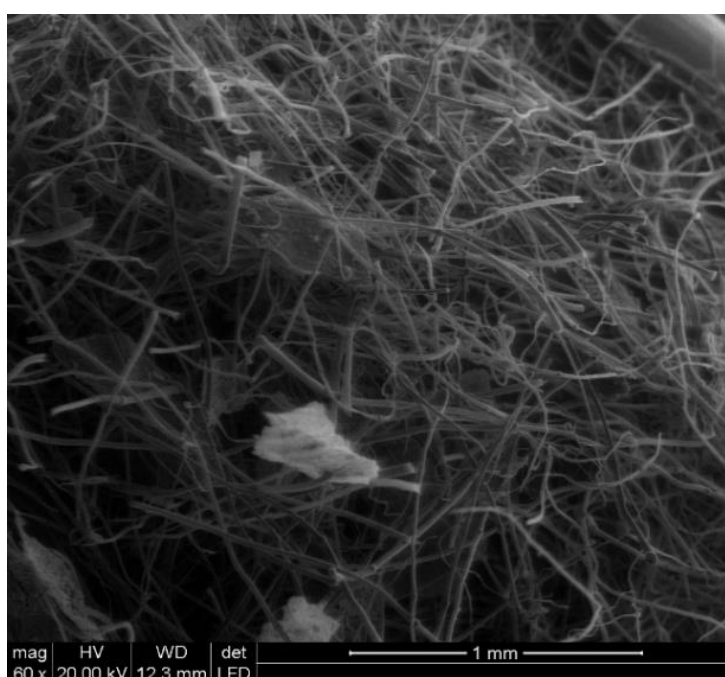


Figura 16. Micrografía ESEM del té de Mursalitsa después de la extracción por agitación magnética 24h.

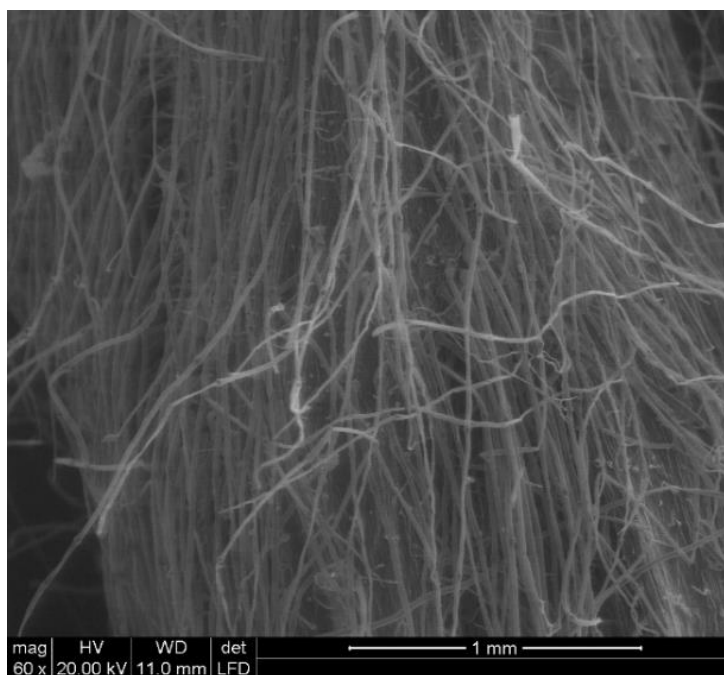


Figura 17. Micrografía ESEM del té de Mursalitsa después de la extracción por ultrasonidos 1h.

Si comparamos las micrografías obtenidas por ESEM, se observa, que después de la agitación magnética 24h (Figura 15) las fibras del té de Mursalitsa son más pequeñas, destruidas seguramente por la agitación. En cambio, con el ultrasonido 1h (Figura 16) presentan un aspecto gastado, debido a las frecuencias producidas.

- **Ñora**

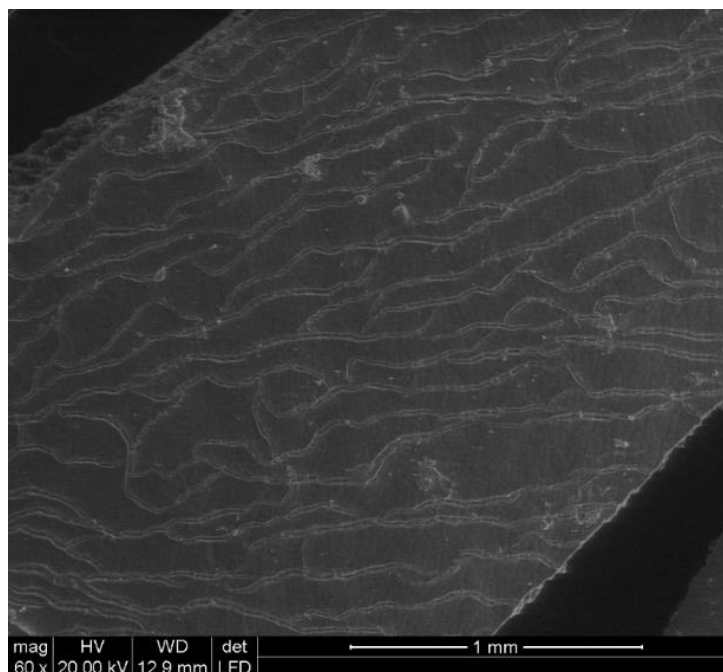


Figura 18. Micrografía ESEM de la ñora

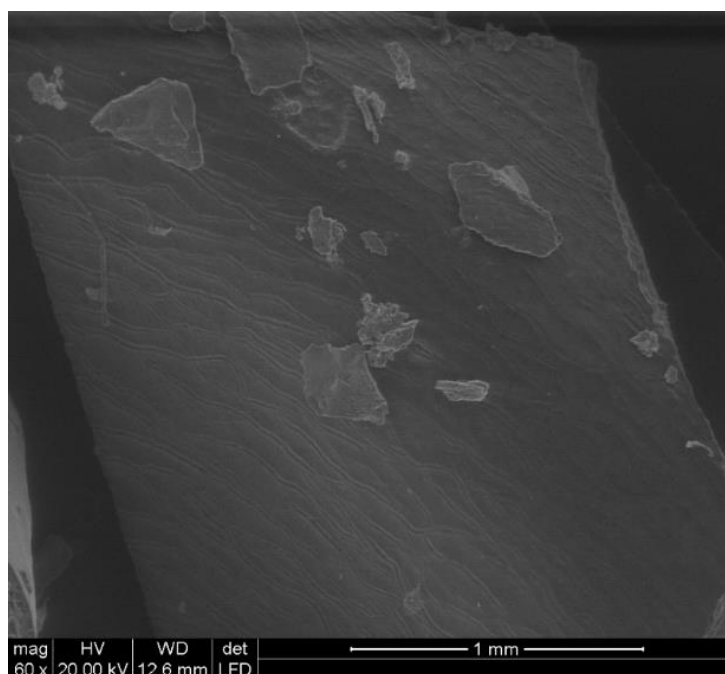


Figura 19. Micrografía ESEM de la ñora después de la extracción por agitación magnética 24h.

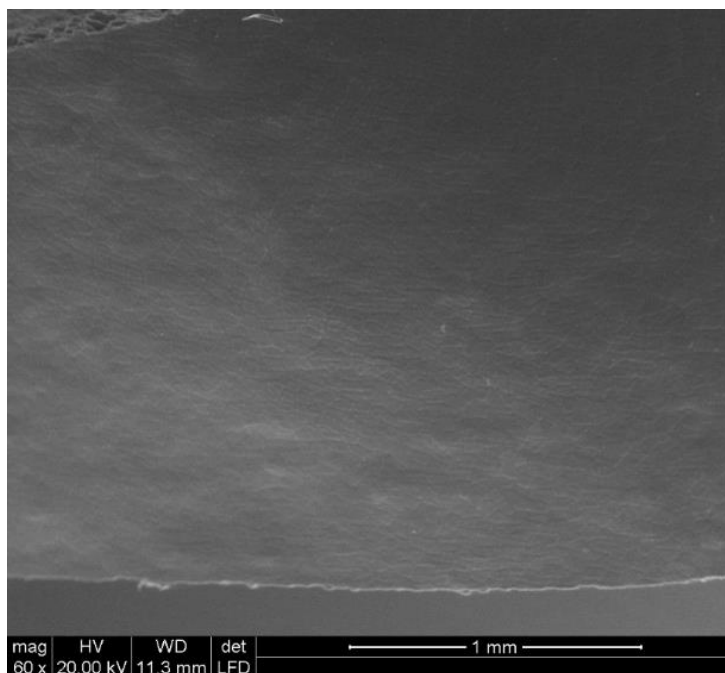


Figura 20. Micrografía ESEM de la ñora después de la extracción por ultrasonidos 1h.

En el caso de la ñora, se puede apreciar que antes de las extracciones (Figura 17) hay una serie de fibras distribuidas por toda su superficie. Después de la extracción por agitación magnética 24h (Figura 18), estas fibras se reducen considerablemente, y en ultra-sonidos 1h (Figura 19) son prácticamente imperceptibles.

- **Ñora seca y triturada**

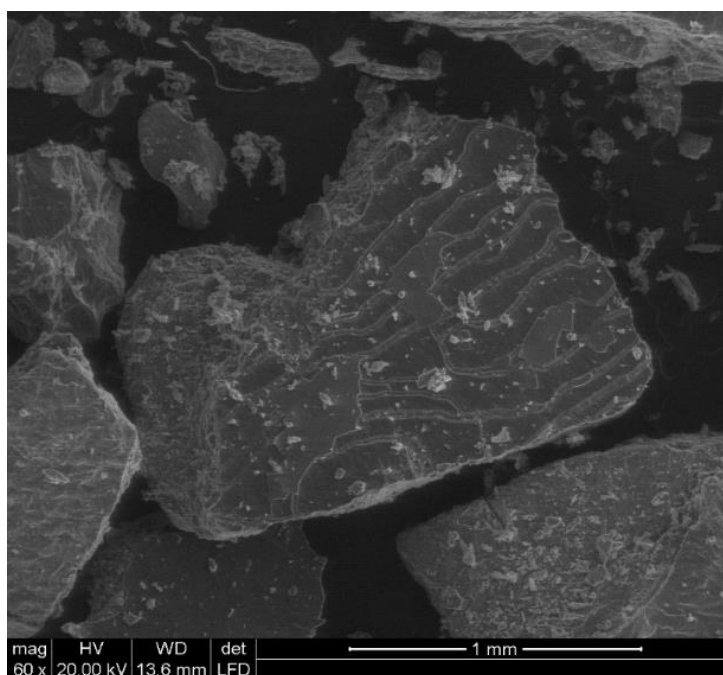


Figura 21. Micrografía ESEM de la ñora seca y triturada

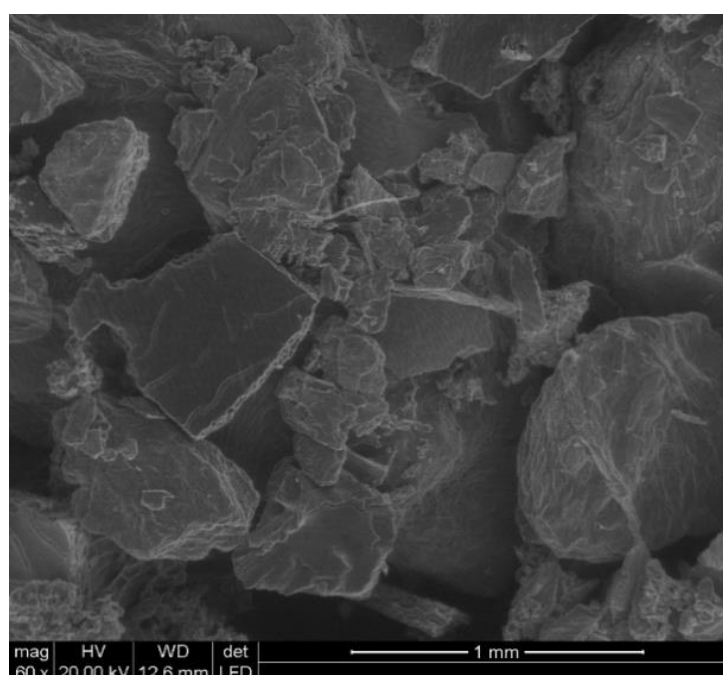


Figura 22. Micrografía ESEM de la ñora seca y triturada después de la extracción por agitación magnética 24h.

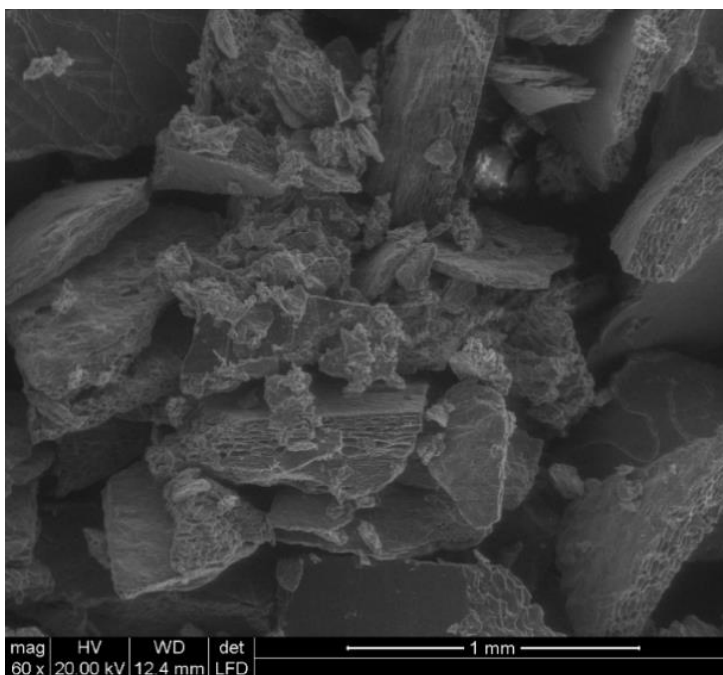


Figura 23. Micrografía ESEM de la ñora seca y triturada después de la extracción por ultrasonidos 1h.

Observando estas tres micrografías, pese a estar trituradas, se siguen viendo las pequeñas fibras antes de la extracción (Figura 20). Si nos fijamos en la Figura 21, hecha después de la extracción por agitación magnética 24h, aún hay pequeños trozos donde se pueden ver estas pequeñas fibras. En cambio, por ultrasonidos 1h (Figura 22) las fibras que se podían observar anteriormente, han desaparecido en la mayoría de los trozos que se pueden observar.

5.5. Ángulo de contacto

- **Té de Mursalitsa**

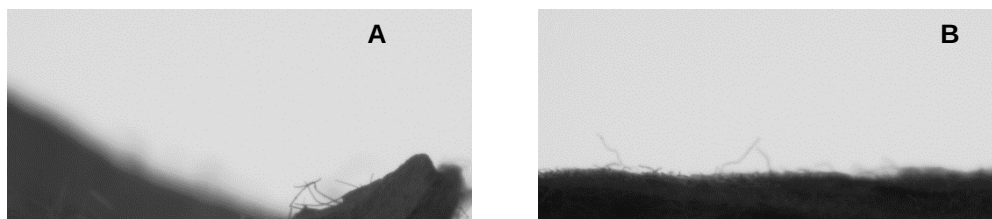


Figura 24. Micrografía del ángulo de contacto del té de Mursalitsa, A: etanol, B: isopropanol

- **Ñora**

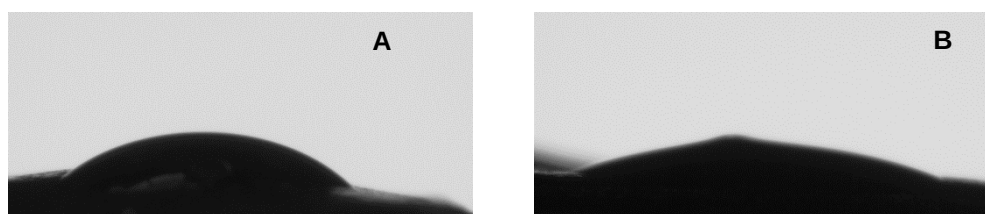


Figura 25. Micrografía del ángulo de contacto de la ñora, parte externa, A: etanol, B: isopropanol

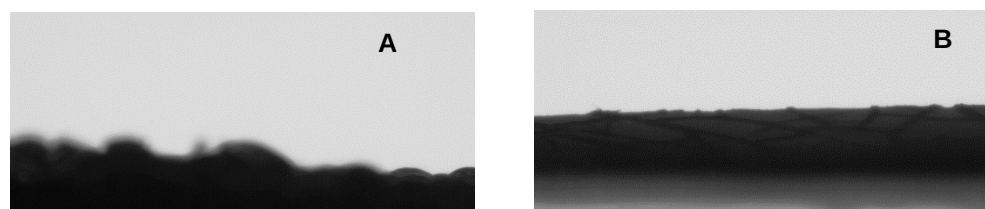


Figura 26. Micrografía del ángulo de contacto de la ñora, parte interna, A: etanol, B: isopropanol

Se puede observar que tanto el té de Mursalitsa (Figura 23), como la parte interna de la ñora (Figura 25) absorben totalmente los dos solventes en el momento de entrar en contacto con estos. En cambio, la parte externa de la ñora (Figura 24) presenta menos afinidad por el solvente.

5.6. Optimización del método de extracción

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos mediante los diferentes métodos de extracciones, las diferentes condiciones y los disolventes utilizados, se puede llegar a la conclusión de que los parámetros óptimos para la extracción de fenoles y flavonoides en el té de Mursalitsa y la ñora son:

- Solvente: etanol
- Método de extracción: ultrasonidos
- Tiempo: una hora

6. Conclusiones

- In nora pepper, phenols and flavonoids were found, second ones in high quantity.
- Optimal method of phenols and flavonoids extraction is ultrasounds method during 1 hour
- The finest dissolvent to extract these compounds is ethanol.
- Mursalski tea has more concentration of phenols and flavonoids in its composition.

7. Bibliografía

- [1] Cervellati, R. *Nuovi argomenti di chimica per l'insegnamento: radicali liberi, antiossidanti e reazioni chimiche oscillanti*; Scaffale CIRE: Milan, 2010; pp 20-22
- [2] Vázquez, C.; De Cos, A. I.; López-Nomdedeu, C. *Alimentación y nutrición: manuela teórico-práctico*; 2da. ed. Díaz de Santos: Madrid-Buenos Aires, 2005; pp 115.
- [3] Haslam, E.; Cai, Y. Plant polyphenols (vegetable tannins): Gallic acid metabolism. *Natural Product Reports*. **1994**, *11*, pp 41–66.
- [4] Tsao, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*. **2010**, *2*, pp 1231-1246.
- [5] Guarnizo Franco, A.; Martínez Yepes, P. N.; *Experimentos de química orgánica: con enfoques en ciencias de la vida*, Elizcom: Quindío, 2009; pp 65-71
- [6] Gelosa, D; Sliepcevich, A. *Fundamentals of chemistry: Chemical laboratory techniques*; EOLSS. (<http://www.eolss.net/sample-chapters/c06/e6-11-02-01.pdf>) (23/04/2016)
- [7] Azuola, R.; Vargas, P. Extracción de sustancias asistidas por ultrasonidos. *Tecnología en marcha*, **2007**, 20-4, pp 30-40.
- [8] Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, R. M.; Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, **1999**, 299, pp 152–178.
- [9] Mabry, T. J.; Markham, K. R.; *The systematic identification of flavonoids*; Springer-Verlag: Nueva York, 1970; pp 51-52.
- [10] Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. *Principles of Instrumental Analysis*; 6a. ed.; CA: Thomson Brooks/Cole; Belmont. 2007. pp 169-173

- [11] McGregor, J. E.; Staniewicz, L.T.; Guthrie Neé Kirk, S. E.; Donald, A. M. Environmental scanning electron microscopy in cell biology. *Methods in molecular biology*. **2013**, 931, pp 493-516.
- [12] Bracco, G.; Holst, B. *Surface science techniques*. Springer, 2013. Pp 3-19.
- [13] Todorova, M.; Trendafilova, A. *Sideritis scardica* Griseb., an endemic species of Balkan peninsula: Traditional uses, cultivation, chemical composition, biological activity. *Journal of ethnopharmacology*. **2014**, 152, pp 256-265.
- [14] Directo al paladar. <http://www.directoalpaladar.com/ingredientes-y-alimentos/noras-indispensables-en-la-cocina> (05/04/2016)
- [15] Tsibranska, I.; Tylkowski, B.; Kochanov, R. Alipieva, K. Extraction of biologically active compounds from *Sideritis* spp. L. *Food and bioproducts processing*. **2011**, 89, pp 273-280
- [16] Influence of the Extraction Method on the Yield of Flavonoids and Phenolics from *Sideritis* spp. (Pirin Mountain tea)
- [17] Gramza, A.; Korczak, J.; Amarowicz, R.; Tea polyphenols – their antioxidant properties and biological activity. *Polish Journal of food and nutrition sciences*. **2005**, 14/55, pp 219-235.
- [18] Ordoñez, A. A. L.; Gomez, J. D.; Vattuone, M. A.; Isla, M. I. Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. *Food chemistry*. **2006**, 97, pp 452-458.