



Universidad Zaragoza

Trabajo Fin de Máster

Caracterización de extractos de plantas como agentes anticoccidicos
para pollos

Autor

Luis José Jiménez Chavarriga

Directoras

M.C. Cristina Nerín de la Puerta

Magdalena Wrona

Zaragoza 2022

Índice

Resumen	1
Abstract	3
1. Introducción	5
2. Objetivos	9
3. Metodología	10
3.1 Muestras	10
3.2 Análisis de compuestos no volátiles mediante UPLC-IMS-QTOF/VION®	11
3.3 Análisis de compuestos volátiles mediante TI-SPME-GC-MS	11
3.3.1 Optimización del método TI-SPME-GC-MS	12
3.4 Análisis de aromas mediante TI-SPME-GC-O-MS	13
3.5 Capacidad antioxidante y fenoles totales	13
3.6.1. DPPH.....	13
3.6.2. ORAC.....	14
3.6.3. Método de generador de radicales libres	14
3.6.4. Fenoles totales.....	15
4. Resultados	16
4.1 Análisis de compuestos no volátiles mediante UPLC-IMS-QTOF/VION®	16
4.2 Análisis de compuestos volátiles mediante TI-SPME-GC-MS	17
4.2.1. Optimización del método TI-SPME-GC-MS.....	17
4.2.2. Análisis cualitativo mediante TI-SPME-GC-MS.....	18
4.3 Análisis de aromas mediante TI-SPME-GC-O-MS	20
4.4 Capacidad antioxidante y fenoles totales	21

5. Conclusiones	22
Bibliografía.....	24

Resumen

Hoy en día, podemos observar un aumento en la demanda de alimentos naturales, sanos y saludables. Como resultado, se inició la búsqueda de nuevas tecnologías para la producción, procesamiento y conservación de alimentos. Además, los consumidores conocedores de la composición nutricional y los ingredientes bioactivos de los alimentos tienen altas exigencias en cuanto a la calidad y seguridad de los productos consumidos. En este sentido, el uso de antioxidantes, antimicrobianos y conservantes naturales se perfila como una alternativa eficaz para la conservación de productos. La gran atención se ha dirigido recientemente hacia la investigación y el aislamiento de compuestos naturales de las plantas. Una de las infecciones principales en la cría de pollos a nivel mundial es la coccidiosis, causada por protozoos parásitos del género *Eimeria*. La infección causa la disminución de enterocitos, del peso corporal y de la producción de huevos. A escala mundial las pérdidas anuales se cifran en más de 3 billones de dólares. EL parásito se combate con drogas/medicamentos sintéticos, pero el aumento observado de resistencias hace necesario explorar nuevas sustancias. Entre ellas, algunos extractos de plantas han mostrado eficacia frente a la coccidiosis.

La *Artemisia annua* L. es una planta con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias y que se ha usado para usos medicinales a lo largo de la historia. A priori tiene potencial como anticoccidica. Esta planta crece en muchas zonas y no necesita unas condiciones difíciles de adquirir, por lo tanto, es una planta muy eficaz para su cultivo y producción en masa para diversas aplicaciones, sin alterar la fauna y flora local durante su cultivo. Es por esto por lo que el objetivo ha sido analizar la variedad de *Artemisia annua* L. para ver si la variedad

Europea con origen en Rumanía tiene las condiciones y características que la harían útil para ser utilizada como base para la fabricación de envases o cajas para transporte avícola. Para ello en este Trabajo de Fin de Máster se han identificado las cualidades químicas del extracto de la planta, entre ellas la capacidad antioxidante para la conservación de alimentos, perfil cualitativo de los compuestos bioactivos entre ellos compuestos no volátiles y volátiles, perfil de aroma. Además, se ha investigado si la planta tiene olor desagradable y al mismo tiempo si puede influir negativamente en los alimentos o animales durante el transporte.

El estudio de capacidad anticoccidica se realizará en Rumanía, fruto de una colaboración del grupo GUIA con el National Institute of R&D for Biological Sciences.

Abstract

Nowadays, we can observe an increase in the demand for healthy and wholesome natural food products. As a result, the search for new technologies for the production, processing and preservation of food began. In addition, consumers who are aware of the nutritional composition and bioactive ingredients of foods have high demands regarding the quality and safety of the products consumed. In this sense, the use of natural compounds such as antioxidants, antimicrobial and preservatives is emerging as an effective alternative for the preservation of products. Great attention has recently been directed towards the investigation and isolation of natural antioxidants from plants. Coccidiosis is one of the most important diseases of poultry worldwide caused by protozoan parasites of the genus *Eimeria*. This infection causes an extensive destruction of the enterocytes, which results in reduced feed efficiency, body weight gain, and a temporary reduction in egg production.

Arthemisia annua L. is a plant with antioxidant and anti-inflammatory properties has a potential anticoccidic behavior and has been historically used for medicinal purposes. This plant grows in many areas and does not need difficult conditions to acquire, therefore it is a very effective plant for its cultivation and mass production for various applications without altering the local fauna and flora during its cultivation. For this reason, the objective was to analyze the variety of *Arthemisia annua* L. to see if the European variety originating in Romania has the conditions and characteristics that would make it useful to be used as a base for the manufacture of containers or boxes for poultry transport. To do this, in this Master Thesis, the chemical qualities of the plant extract have been identified, including the antioxidant capacity for food preservation, qualitative profile of bioactive compounds, including non-volatile and volatile compounds, aroma profile.

In addition, it has been investigated whether the plant has an unpleasant odor and at the same time whether it can negatively influence food or animals during transportation.

The anticoccidic behavior will be studied in Rumania, as result of a collaboration between the GUIA research group at the University of Zaragoza and the National Institute of R&D for Biological Sciences.

1. Introducción

Hoy en día, podemos observar un aumento en la demanda de productos alimenticios naturales sanos y saludables. Como resultado, se inició la búsqueda de nuevas tecnologías para la producción, procesamiento y conservación de alimentos (Ouahioune et al., 2022; Wrona et al., 2015, 2017). Además, los consumidores conocedores de la composición nutricional y los ingredientes bioactivos de los alimentos tienen altas exigencias en cuanto a la calidad y seguridad de los productos consumidos (Gavril et al., 2019). En este sentido, el uso de antioxidantes naturales se perfila como una alternativa eficaz para la conservación de productos. La gran atención se ha dirigido recientemente hacia la investigación y el aislamiento de antioxidantes naturales de las plantas por ejemplo (Gallego Iradi, 2016):

- compuestos fenólicos que constituyen una de las principales clases de metabolitos secundarios de las plantas, donde desempeñan diversas funciones fisiológicas. Los compuestos fenólicos presentan un anillo benceno hidroxilado como elemento común en sus estructuras moleculares.
- compuestos terpénicos con carácter fenólico aislados de especias y/o hierbas aromáticas poseen gran capacidad antioxidante. Por ejemplo, compuestos extraídos a partir de aceites esenciales de orégano, borraja y salvia han sido estudiadas por su potencial antioxidante. Estos compuestos suelen mostrar actividad antimicrobiana que los hace útiles para mejorar la seguridad alimentaria del producto final.

Entre las técnicas que se usan (Fernández Agulló, 2021):

- Extracción Soxhlet: En esta técnica, la matriz vegetal se introduce en el interior de un

cartucho de celulosa. En la parte inferior se pone disolvente y en la parte superior un sistema de condensación. El disolvente se calienta a ebullición y al condensar, queda recogido en la cámara del Soxhlet donde se pone en contacto con la planta. Cuando la cámara se llena, el sistema hace vacío natural, sifoma el extracto y lo revierte al matraz inferior con el resto de disolvente. La extracción se controla por el número de sifonadas en el tiempo. Cada sifonada supone que la planta se ha extraído con nuevo disolvente, pero el volumen total no cambia. Por ello, se considera un sistema de extracción secuencial muy eficaz, en el que no hay saturación.

- Maceración con disolventes: En la maceración con disolventes, el material vegetal se pone en contacto directo con el disolvente. La temperatura del proceso es inferior a la de la extracción Soxhlet y su principal ventaja es que no se evaporan los compuestos volátiles. Sin embargo, el disolvente puede saturarse y la eficacia del proceso es inferior a la de Soxhlet. En esta técnica es necesaria una etapa de filtración para separar el disolvente con el extracto disuelto de la matriz vegetal. Un buen ejemplo es la *Bixa orellana* L. de cual se extraen sus compuestos fenólicos con etanol 95% a una temperatura de 4 °C (Rincón et al., 2016).
- Extracción asistida por microondas (EAM) Se realiza en un microondas pudiendo controlar las condiciones. Debido a los cambios bruscos de temperatura y a la presión localizada se ven afectadas las propiedades de las paredes celulares favoreciendo su ruptura y la liberación de los compuestos bioactivos.

La *Artemisia annua* L.– familia Asterácea, también conocida como «ajenjo anual» es una hierba muy aromática con hojas verdes y que puede alcanzar una altura máxima de 200 cm. Tiene tallo ramificado desde abajo. Hojas tomentosas en el envés, verde intenso en el ápice que también presenta manchas glandulares. Figura 1 muestra fotografía de la planta.



Figura 1. Fotografía de la planta *Artemisia Annu* L.

La *Artemisia annua* L. es originaria de las altas mesetas de China, donde crece en la vegetación de la estepa (40° de latitud norte – 1000 a 1500 m de altitud). Actualmente el área de distribución natural de la artemisa es el sureste de Europa y el oeste de Asia. A finales del siglo XIX, llegó a Europa occidental y meridional junto con el algodón, los cereales y la lana. Ha tenido usos en medicina tradicional oriental como medicamento antiinflamatorio (Huang et al., 1993), antiasmático, antimalárico (Klayman, 1985), antitumoral, aleopático. Incluso se llegó a investigar si esta planta pudiera servir para la curación de COVID-19 por su parecido con el plasmodium de la malaria ChemRxiv (Zheng, 1994). Además, es un antiviral que funciona para diferentes variedades de COVID como MERS-CoV y SARS-CoV (“Redeploying Plant Defences,” 2020).

La fabricación de envases o cajas para transporte avícola podría estar basada en la incorporación de extracto de *Artemisia Annu* L. para prevenir la coccidiosis en las aves (Debbou-louknane et al., 2019). Esta es una enfermedad provocada por coccidio, que son protozoos que hacen que las células del intestino de los pollos exploten y por ello los pollos pueden sufrir problemas de salud, tal como se ha indicado antes. Se transmite cuando los pollos comen desechos de otros pollos. Cuando se transmite a los humanos por la ingesta de pollos provoca diarrea e incluye la combinación del aumento de la permeabilidad intestinal,

la secreción de cloro y la mala absorción de nutrientes como consecuencia de la destrucción de las vellosidades intestinales. Se ha intentado prevenirla con extractos herbáceos (Debbou-louknane et al., 2019). En individuos inmunodeprimidos, la infección se limita al intestino delgado. El estado inmunológico del huésped es el factor predisponible más importante para la severidad del cuadro clínico, sin embargo, no todas las formas de inmunosupresión llevan al aumento de la virulencia (García Dávila & Rivera Fernández, 2017).

2. Objetivos

El objetivo principal de este Trabajo Fin de Máster fue caracterizar las principales propiedades químicas del extracto de la *Artemisia annua* L. para ver si puede ser usada como producto de base para la fabricación de envases para alimentos o jaulas para transporte de aves. Se ha establecido además como hipótesis que el extracto de *Artemisia annua* L. de Rumania ayuda a prevenir la coccidiosis en las aves.

Debido a que las condiciones ambientales condicionan el tipo de plantas y su composición química es necesario comprobar los componentes del extracto de la *Artemisia* de origen Rumano que nunca ha sido estudiado. El planteamiento consistió en comprobar sus propiedades químicas para continuar su futura comercialización como agente activo. Los objetivos específicos de la investigación eran:

- Análisis de los compuestos no volátiles mediante cromatografía líquida de alto rendimiento UPLC-IMS-QTOF/VION[®] ;
- Análisis de componentes volátiles mediante extracción en fase sólida en modo inmersión total, acoplada a cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (TI-SPME-GC-MS);
- Análisis de aromas mediante extracción en fase sólida en modo inmersión total acoplada a cromatografía de gases con olfatometría y detector de espectrometría de masas (TI-SPME-GC-O-MS);
- Capacidad antioxidante (DPPH, ORAC, método de generador de radicales libres) y
- Cantidad de fenoles totales.

3. Metodología

3.1 Muestras

La materia prima de las muestras de *Artemisia annua* L. se recolectó a mediados de mayo de 2019 de la flora silvestre de Rumania, de ubicaciones N-E en el condado de Neamt (Moldavia occidental, Rumania, situada en las montañas de los Cárpatos orientales) con las coordenadas 46°54'39"N 26 °5'28"E.

El espécimen de la planta fue depositado en el herbario NIRDBS/ Centro de Investigación Biológica 'Stejarul', Rumania. La materia prima se secó a temperatura ambiente en espacios especiales para la conservación de las plantas medicinales, por lo que para el presente estudio se utilizó materia seca de la parte aérea en flor.

El extracto se obtuvo de la parte aérea seca de la planta. Se ha realizado extracción Soxhlet usando etanol (20:100 g/mL), a 60 °C durante 9 h. El extracto ha sido preparado por el Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo de Ciencias Biológicas de Bucarest, Rumania. Figura 2 presenta proceso de extracción de la muestra de *Artemisia annua* L.



Figura 1. Proceso de extracción Soxhlet de la muestra de *Artemisia annua* L.

3.2 Análisis de compuestos no volátiles mediante UPLC-IMS-QTOF/VION®

Análisis de compuestos no volátiles se ha realizado inyectando el extracto directamente en AcquityTM UPLC acoplado a ESI y un detector IMS-QTOF/VION[®] (Waters; Manchester, UK). Se ha utilizado la columna UPLC BEH C18 (2,1 x 100 mm x 1,7 µm) termostata a una temperatura de 40 °C. La fase móvil ha sido mezcla de (A) ácido fórmico 0,1% en agua y (B) ácido fórmico 0,1% en metanol en modo positivo y (A) agua y (B) metanol en modo negativo. Se ha aplicado gradiente con las siguientes condiciones de elución: tiempo inicial 95% A y 5% B; a los 7 min 0% A y 100% B hasta los 11 min; a los 11,10 min 95% A y 5% B hasta los 13 min. El flujo de fase móvil ha sido de 0,3 mL/min y un volumen de inyección de 5 µL. Se ha aplicado voltaje capilar de 1 kV y un voltaje de cono de muestreo de 30 V. La temperatura de la fuente ha sido de 120 °C y la desolvatación a 500 °C. La velocidad del flujo de gas ha sido de 800L/h. También se ha realizado el análisis del blanco. Las muestras se han analizado por triplicado.

3.3 Análisis de compuestos volátiles mediante TI-SPME-GC-MS

Los compuestos volátiles de los extractos se han analizado mediante microextracción en fase sólida de inmersión total (TI-SPME) acoplada a cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS). Cada extracto se ha diluido 5 veces con agua ultrapura. El análisis cromatográfico se ha realizado con un muestreador automático CTC Analytics de Agilent Technologies (Madrid, España). Se ha utilizado un GC Agilent 6890N acoplado a un detector selectivo de masas Agilent MS 5975B. Los análisis TI-SPME-GC-MS se han realizado con fibra de divinilbenceno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) de 50/30 µm de Supelco (Bellefonte, PA, EE. UU.) previamente acondicionada antes de la primera extracción según

las especificaciones del fabricante. Las condiciones de extracción han sido las siguientes: temperatura de extracción de 80 °C, tiempo de extracción de 15 min y tiempo de desorción de 2 min. La inyección se ha realizado en modo splitless. Se ha utilizado helio como gas portador a un caudal de 1,0 mL/min. La temperatura del horno ha sido la siguiente: 40 °C durante 2 min, con una velocidad de 10 °C min hasta 300 °C mantenidos durante 2 min. Los compuestos volátiles se separaron en una columna HP-5MS GC (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm de espesor de película, Agilent). También se ha realizado el análisis del blanco. Las muestras se han analizado por triplicado. Se ha realizado la optimización del método analítico antes del análisis.

3.3.1 Optimización del método TI-SPME-GC-MS

También se han optimizaron las condiciones de extracción TI-SPME. El primer paso fue seleccionar la fibra SPME más adecuada para cada muestra. Se probaron tres fibras con diferentes polaridades y espesores para cubrir todos los rangos de posibles analitos:

(a) fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 μm (roja), (b) fibra de divinilbenceno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) de 50/ 30 μm (gris) y c) fibra de poliacrilato (PA) (blanca). Todas las fibras fueron suministradas por Supelco. Además, se comprobaron las temperaturas de adsorción (40, 60 y 80 °C) y los tiempos de adsorción (10, 20 y 30 min). La optimización se ha realizado utilizando el programa de software de diseño experimental MODDE 6.0 de Umetrics (Umeå, Suecia).

3.4 Análisis de aromas mediante TI-SPME-GC-O-MS

Los aromas se han analizado mediante microextracción en fase sólida en modo de inmersión total (TI-SPME) acoplada a cromatografía de gases-espectrometría de masas y olfatometría (GC-O-MS). Se ha utilizado el mismo método presentado en el apartado 3.3.

Además, el análisis del aroma ha sido realizado por el panelista usando el puerto del olfatómetro oliendo la muestra tres veces y evaluando las propiedades del aroma (tipo e intensidad) de cada compuesto detectado.

3.5 Capacidad antioxidante y fenoles totales

3.6.1. DPPH

Para esta prueba, se han preparado tres diluciones diferentes de extracto en metanol. La reacción se ha desencadenado al agregar 100 μ L de cada extracto a 3,5 mL de una solución de 30 μ g/g de DPPH en metanol. También se ha preparado una disolución en blanco de DPPH en metanol. Todas las muestras se han almacenado durante 15 min en la oscuridad antes de medir la absorbancia a 515 nm. Las medidas espectrofotométricas se han realizado frente a un blanco de metanol y también se ha realizado una calibración adicional para verificar la concentración de DPPH (Pyrzynska & Pękal, 2013). La capacidad antioxidante de las muestras se expresó como el porcentaje de inhibición de DPPH (I%) que se calculó según la fórmula 1.

$$I\% = [(A_0 - A)/A_0] \times 10 \quad (1)$$

donde A_0 y A son los valores de absorbancia del blanco (DPPH en metanol) y la muestra de extracto (DPPH con extracto) respectivamente. El valor de I% después de 15 min se graficó frente a la concentración de A_0 y se ha realizado un análisis de regresión lineal para

obtener el valor de la mitad de la concentración inhibitoria máxima (IC_{50}) que es inversamente proporcional a la capacidad de antioxidación.

3.6.2. ORAC

El segundo método utilizado ha sido el ensayo de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) que se ha realizado mediante el método optimizado por Bentayeb, Vera, Rubio y Nerin (Bentayeb et al., 2009).

Las disoluciones estándar de fluoresceína (2,3 $\mu\text{g/g}$) y AAPH (34 mg/g) se han preparado en tampón de fosfato de sodio (75 mM, pH 7,0). El ensayo de ORAC se ha realizado mezclando 0,2 mL del extracto antioxidante con 1,9 mL de fluoresceína en una cubeta de espectrofotómetro de 10 mm de paso óptico. La reacción se ha desencadenado mediante la adición de 1,4 mL de solución de AAPH. Luego, la mezcla se ha agitado brevemente y se ha controlado la absorbancia a 490 nm usando un espectrofotómetro. Se ha usado el tampón como blanco del método. La reacción se ha llevado a cabo a 40 °C durante 60 min utilizando el modo cinético. Se ha preparado recta de calibrado de cinco concentraciones de Trolox (25, 50, 100, 150, 250 mg/kg). Los resultados se han expresado en mg equivalentes de Trolox (GAE) por gramo de extracto (mg Trolox/g) (Bentayeb et al., 2009).

3.6.3. Método de generador de radicales libres

Consiste en generar una corriente de radicales libres hidroxilo en fase gas que se expone a la muestra objeto de estudio, impregnada en este caso en lana de vidrio. Se mide la capacidad scavenger de radicales libres de la muestra se compara con el blanco. Se trata de un análisis cuantitativo. La generación de radicales se ha realizado gracias a una reacción fotoquímica en combinación de niebla de peróxido de hidrógeno y radiación UV. Como resultado de la reacción de los radicales hidroxilo con la muestra que se deposita en lana de

vidrio. Los radicales no consumidos por la muestra o el blanco se recogen en la disolución de 2 µg/g de salicilato de sodio donde se genera ácido 2,5-dihidroxibenzoico (2,5-DHB). Dicho compuesto se identifica usando HPLC (Waters 2795 Series) con detector de fluorescencia 474 (Milford, EE. UU.). El ensayo se ha realizado durante 24h en triplicado. La capacidad antioxidante se expresa como porcentaje de hidroxilación (H%) (Pezo et al., 2006, 2008), a través de la medida cuantitativa del 2,5-DHB.

3.6.4. Fenoles totales

Se ha aplicado el método de Folin-Ciocalteu [28,29] con ligeras modificaciones de la siguiente manera: se ha mezclado 0,1 mL de extracto con 0,5 mL de reactivo puro de Folin-Ciocalteu, 0,4 mL de etanol al 80% (v/v) y 8 mL de agua ultrapura. Luego la mezcla se somete a extracción ultrasónica con frecuencia de 40 Hz a temperatura ambiente por 30 min. En el siguiente paso se ha añadido 1 mL de Na₂CO₃ al 20% (p/v) y los tubos de reacción se han mantenido en la oscuridad durante 30 min y se ha leído la absorbancia a 760 nm usando un espectrómetro. Todas las medidas se han realizado frente al blanco. Todas las muestras se han preparado por triplicado. Se ha preparado recta de calibrado de cinco concentraciones de ácido gálico (40, 80, 160, 240, 340 mg/kg). La concentración de fenoles totales se ha calculado mediante la curva de calibración y se ha expresado en mg equivalentes de ácido gálico (GAE) por gramo de extracto (mg GAE/g) (Palomino G et al., 2009).

4. Resultados

4.1 Análisis de compuestos no volátiles mediante UPLC-IMS-QTOF/VION®

Los resultados de análisis cualitativo de compuestos no volátiles aparecen en la tabla 1.

Tabla 1. Resultados de análisis cualitativo de compuestos no volátiles.

No	Tiempo de retención (min)	m/z	Compuesto	CCS	CAS
Modo Positivo (ESI +)					
1	0,73	365,10043	(+)-Lactosa	169,99	64044-51-5
2	3,72	317,0647	Quercetina	162,82	117-39-5
3	4,27	512,2310	(R)-(+)-Ácido rosmarínico	178,18	20283-92-5
4	4,56	317,0647	Isorhamnettina	-	480-19-3
5	4,69	287,0500	Kaempferol	160,02	520-18-3
6	5,14	331,0805	Tricina	169,99	5704-04-1
7	5,61	345,0957	Ácido usnic	162,82	7562-61-0
8	6,93	223,0601	3,4 diacetoxidibenceno	-	120-14-9
9	7,08	283,1501	Artemisina	-	63968-64-9
Modo Negativo (ESI -)					
1	0,74	377,0842	D-(+)-Trehalosa	230,05	6138-23-4
2	2,36	207,0304	Fraxetina	-	574-84-5
3	3,04	387,1648	12-O-Glucopiranosil-ácido jasmodico	-	-
4	3,64	353,0872	Acido clorogénico	170,48	327-97-9
5	3,89	477,1035	Isohamnettina-3-glucosido	-	5041-82-7
6	4,05	507,1134	Ssiringetina-3-glucosido	-	-
7	4,27	293,2123	(R)-(+)-Ácido rosmarínico	184,08	20283-92-5
8	4,69	285,0410	Kaempferol	158,45	520-18-3
9	6,06	283,0599	Parietina	-	521-61-9
10	7,17	297,2429	Ácido heptadecanoico	186,63	506-12-7
11	8,67	369,3362	Ácido-2-hidrocitrihexanoico	230,05	2718-37-8
12	11,14	423,4198	Ácido montánico	-	506-48-9

El análisis llamado screening de compuestos no volátiles permite determinar un número considerable de compuestos químicos, a menudo nunca estudiados, en una sola inyección de muestra. Esta investigación tuvo como objetivo examinar todas las posibles moléculas presentes en la muestra de la planta. Se han detectado 19 compuestos no volátiles diferentes. La mayoría de ellos son flavonoides que actúan en las plantas como antioxidantes y antimicrobianos (Pietta, 2000).

Además, entre los compuestos no volátiles se han encontrado compuestos interesantes de uso industrial como el ácido rosmarínico que se usa en la industria cosmética. También se han encontrado otros compuestos interesantes para los usos que se le pretende dar, como la parietina que es un agente anti-hongo. La tricina que es un buen scavenger de radicales OH. y podría explicar los resultados obtenidos en generador de radicales.

4.2 Análisis de compuestos volátiles mediante TI-SPME-GC-MS

4.2.1. Optimización del método TI-SPME-GC-MS

El tipo de fibra se ha elegido tras analizar los cromatogramas. Se ha observado que el mayor número de picos correspondientes a los compuestos volátiles se ha obtenido con la fibra gris. La Figura 2 que representa la superficie de respuesta de los parámetros optimizados indica que la mejor combinación de los parámetros son 10 minutos y 80 °C, los cuales se han elegido para análisis de compuestos volátiles y también aromas.

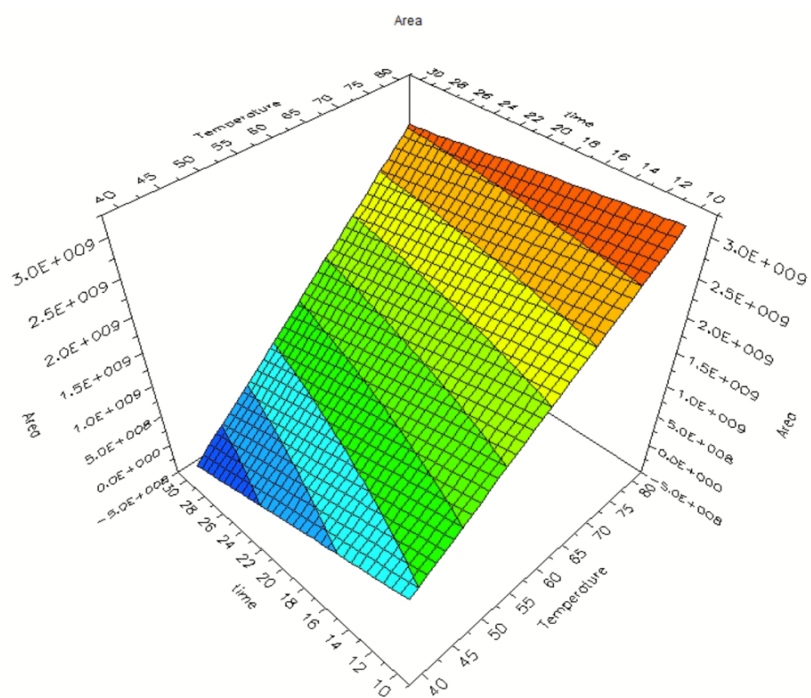


Figura 3. Superficie de respuesta de optimización del método TI-SPME-GC-MS.

4.2.2. Análisis cualitativo mediante TI-SPME-GC-MS

Tabla 2. Resultados de análisis cualitativo de compuestos volátiles.

No	Tiempo de retención (min)	Compuesto	CAS
1	9,12	alpha-Pineno	80-56-8
2	9,51	6-Isopropilideno-1-metil-biciclo[3.1.0]hexano	24524-57-0
3	10,13	3-Careno	13466-78-9
4	10,70	2-Metil-5-(1-methilethil)-biciclo[3.1.0]hex-2-eno	002867-05-2
5	11,12	o-Cumeno	527-84-4
6	11,22	Eucaliptol	470-82-6
7	11,75	alpha-Felandrene	99-83-2
8	12,66	4-Metiy-1-(1-methiletil)-biciclo[3.1.0]hexan-3-ona	1125-12-8
9	12,85	1-Metoxy-1,3-ciclohexadieno	2161-90-2
10	13,36	2-Careno	554-61-0
11	13,53	Thujona	546-80-5
12	13,88	Terpinen-4-ol	562-74-3
13	14,05	Dodecano	112-40-3
14	14,83	Camfor	464-49-3
15	15,59	p-Cymen-7-ol	536-60-7

16	15,69	Acetato 2-methyl-5-(1-methylethyl)-phenol	6380-28-5
17	16,40	Cumin aldehido	122-03-2
18	16,69	alpha-Cubeno	17699-14-8
19	16,81	Bifenil	92-52-4
20	16,88	Tetradecano	629-59-4
21	17,10	Difenil eter	101-84-8
22	17,31	Carofillene	87-44-5
23	17,98	Eugenol	97-53-0
24	18,22	Alloaromadendreno	25246-27-9
25	18,29	beta-Longipineno	41432-70-6
26	18,58	cis-Calameneno	72937-55-4
27	18,83	alpha-Calacoreno	21391-99-1
28	19,31	beta-Salineno	107066-67-0
29	20,08	tau-Muurolol	19912-62-0
30	21,77	Valerenico acido, methyl ester	1000453-13-7
31	25,80	alpha-Santonino	481-06-1

Se han detectado 31 compuestos volátiles diferentes entre ellos terpenos. Debido a su comportamiento antioxidante, se ha demostrado que los terpenos brindan una protección relevante en condiciones de estrés oxidativo en diferentes enfermedades (Gonzalez-Burgos & Gomez-Serranillos, 2012). El análisis detallado y el perfilado de compuestos volátiles en muestras de plantas de la misma especie, pero de diferentes regiones geográficas, en este caso Rumania, pueden ayudar a controlar el tipo y la concentración de metabolitos producidos por estas plantas. De esta forma, es posible determinar el mejor perfil antioxidante de los compuestos volátiles de origen vegetal.

Además, se han encontrado varios compuestos susceptibles de que se detecten en un análisis de olfatometría, que es necesario, puesto que la nariz humana puede detectar olores que el cromatógrafo no ve.

4.3 Análisis de aromas mediante TI-SPME-GC-O-MS

Los resultados de análisis cualitativo se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Resultados de análisis de aromas mediante TI-SPME-GC-O-MS.

No	Tiempo de retención (min)	Compuesto	CAS	Aroma	Clase de aroma
1	11,60	alpha-Fellandreno	99-83-2	Eneldo	Hierbas
2	13,30	2-Careno	554-61-0	Piel de naranja	Cítricos
3	13,60	Thujona	546-80-5	Herbario	Hierbas
4	14,28	Camfor	464-49-3	Alcanfor	Hierbas
5	15,97	Cumin aldehido	122-03-2	Acido	Animal
6	17,30	Eugenol	97-53-0	Clavo, miel	Espicias dulces
7	18,60	Alloaromadendreno	25246-27-9	Leñoso	Vegetal
8	18,91	beta-Salineno	107066-67-0	Herbario	Hierbas

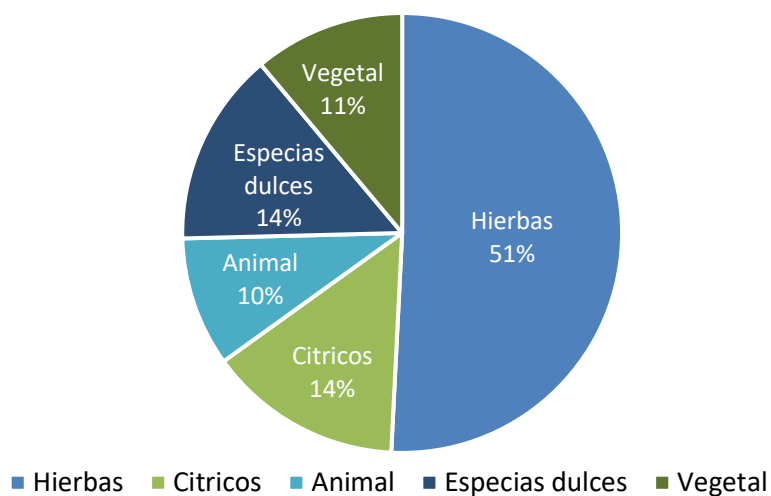


Figura 4. Diagrama circular de distribución de clases de aromas en la muestra analizada.

Los compuestos olorosos se han clasificado en clases de aromas según Flavornet, que sugiere la clasificación de olores en 25 clases diferentes. El diagrama circular de aroma del extracto se ha dibujado de acuerdo con el porcentaje de intensidades de olor de los resultados de la olfatometría (Figura 4).

De acuerdo con los resultados de TII-SPME-GC-O-MS, los descriptores de aroma en el extracto de *Artemisia annua* L. se clasificaron como herbal, ácido, amaderado, especiado y cítrico. Son olores por lo general agradables y no hacen pensar que vayan a suponer un problema para el bienestar de los trabajadores que tengan que usar un material fabricado con esta planta o para que afecte negativamente al sabor de los alimentos que transporte.

4.4 Capacidad antioxidante y fenoles totales

Los resultados de capacidad antioxidante y fenoles totales se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. Resultados de capacidad antioxidante y fenoles totales en el extracto.

Muestra	DPPH ($\mu\text{g/g}$)*	ORAC (mg Trolox/g de extracto)*	Generador de radicales hidroxilo (%)	Fenoles totales (mg GAE/ g de extracto)*
Extracto de <i>Artemisia annua</i> L.	$15,2 \pm 0,003$	$210,6 \pm 27,5$	$56,4 \pm 3,2$	$147,8 \pm 1,2$

* Rectas obtenido con $r = 0,9993$ para DPPH; $r = 0,9962$ para ORAC; $r = 0,9989$ para fenoles totales.

El método DPPH se refiere a la oxidación /reducción como la transferencia de átomos de hidrógeno, el método ORAC se refiere a la transferencia de un solo electrón como oxidación y reducción. Cuando el método de fenoles totales podríamos considerarlo un método complementario en el cual se cuantifica la cantidad de sustancias fenólicas las cuales tienen un alto poder antioxidante. Por último, el método de generador de radicales podríamos considerarlo uno de los métodos directos y más prácticos ya que somete a muestra a una alta cantidad de radicales OH.

Los resultados han sido buenos en DPPH mostrando una capacidad de transferir átomos de H alta. En ORAC sin embargo los resultados han sido impresionantes mostrando

una capacidad de mg de Trolox/g de extracto cuando una cantidad de un ciento de $\mu\text{g/g}$ ya es considerada buen antioxidante. Eso hace pensar que el extracto de *Artemisia annua* L. es un muy buen candidato para fabricar envases activos con él. Aparte, al ser muy antioxidante para transferencia de electrones, más incluso que para H, se puede suponer que será más capaz contra un variado número de sustancias oxidantes las cuales no emplean la transferencia de hidrógeno. Los resultados han sido bastante buenos en % de hidroxilación reaccionando con los radicales con más de la mitad de ellos. En cuanto a los fenoles totales como era de esperar son muy altos. De todo ello se concluye que la capacidad antioxidante especialmente ante especies oxidantes cuyo mecanismo sea de transferencia de electrones es elevada y suficiente para continuar con los ensayos para envase activo.

5. Conclusiones

El análisis del aroma de *Artemisia annua* L. se ha realizado mediante TI-SPME-GC-O-MS aplicando dos detectores diferentes: MS y nariz humana. Además, se han determinado sus perfiles con un amplio número de compuestos volátiles principalmente terpenos. Se investigaron exhaustivamente las percepciones predominantes de los compuestos aromáticos. Se han detectado 19 compuestos no volátiles diferentes. La mayoría de ellos son flavonoides. A destacar de los compuestos no volátiles está la parietina que previene el moho.

Además, Se han observado capacidades antioxidantes muy fuertes evaluadas por métodos con diferentes mecanismos de reacción y relacionadas con la composición del extracto. Cabe destacar que el olor y la capacidad antioxidante son las propiedades más importantes e interesantes de los extractos de plantas. Su estudio es sumamente importante desde el punto de vista de la industria alimentaria ya que esto afecta a características organolépticas de los productos. Aparte de ello es recomendable tanto para los trabajadores

como para evitar importunar a poblaciones cercanas trabajar con materiales que no produzcan malos olores que se añadan a los ya de por si malos olores, que puede generar una granja o la industria alimentaria.

Para concluir es una planta con amplias posibilidades para la fabricación de envases en potencia y sería interesante continuar con los estudios para ver si se puede usar para transporte de alimentos o aves, eso sí dado que las características de las plantas pueden cambiar según el lugar donde crecen no se puede asegurar que se pudiera criar Artemisa para estos fines en España.

Bibliografía

- Bentayeb, K., Vera, P., Rubio, C., & Nerin, C. (2009). Adaptation of the ORAC assay to the common laboratory equipment and subsequent application to antioxidant plastic films. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394(3), 903–910. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2766-0>
- Debbou-louknane, N., Nerín, C., Amrane, M., Ghemghar, M., Madani, K., & Ayad, A. (2019). In Vitro Anticoccidial Activity of Olive Pulp (*Olea europaea* L. var. Chemlal) Extract Against *Eimeria* Oocysts in Broiler Chickens. *Acta Parasitologica*, 64(4). <https://doi.org/10.2478/s11686-019-00113-0>
- Fernández Agulló, A. (2021). *Obtención de antioxidantes naturales a partir de residuos lignocelulósicos*.
- Gallego Iradi, M. G. (2016). Estudio de la actividad antioxidante de diversas plantas aromáticas y/o comestibles. *TDX (Tesis Doctorals En Xarxa)*.
- García Dávila, P., & Rivera Fernández, N. (2017). El ciclo biológico de los coccidios intestinales y su aplicación clínica. *Revista de La Facultad de Medicina de La UNAM*.
- Gavril, G. L., Wrona, M., Bertella, A., Świeca, M., Râpă, M., Salafranca, J., & Nerín, C. (2019). Influence of medicinal and aromatic plants into risk assessment of a new bioactive packaging based on polylactic acid (PLA). *Food and Chemical Toxicology*, 132, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110662>
- Gonzalez-Burgos, E., & Gomez-Serranillos, M. P. (2012). Terpene Compounds in Nature: A Review of Their Potential Antioxidant Activity. *Current Medicinal Chemistry*, 19(31), 5319–5341. <https://doi.org/10.2174/092986712803833335>
- Huang, L., Liu, J. F., Liu, L. X., Li, D. F., Zhang, Y., Nui, H. Z., Song, H. Y., & Zhang, C. Y. (1993). Antipyretic and anti-inflammatory effects of *Artemisia annua* L. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi = Zhongguo Zhongyao Zazhi = China Journal of Chinese Materia Medica*, 18(1).
- Klayman, D. L. (1985). Qinghaosu (artemisinin): An antimalarial drug from China. *Science*, 228(4703). <https://doi.org/10.1126/science.3887571>
- Ouahioune, L. A., Wrona, M., Nerín, C., & Djenane, D. (2022). Novel active biopackaging incorporated with macerate of carob (*Ceratonia siliqua* L.) to extend shelf-life of stored

- Atlantic salmon fillets (*Salmo salar* L.). *LWT*, *156*, 113015. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.113015>
- Palomino G, L. R., García P, C. M., Gil G, J. H., Rojano, B. A., & Durango R, D. L. (2009). Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). *Vitae*, *16*(3).
- Pezo, D., Salafranca, J., & Nerín, C. (2006). Design of a method for generation of gas-phase hydroxyl radicals, and use of HPLC with fluorescence detection to assess the antioxidant capacity of natural essential oils. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *385*, 1241–1246. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0395-4>
- Pezo, D., Salafranca, J., & Nerín, C. (2008). Determination of the antioxidant capacity of active food packagings by in situ gas-phase hydroxyl radical generation and high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, *1178*(1–2), 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.11.062>
- Pietta, P.-G. (2000). Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, *63*(7), 1035–1042. <https://doi.org/10.1021/np9904509>
- Pyrzyńska, K., & Pełkał, A. (2013). Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. *Analytical Methods*, *5*, 4288–4295. <https://doi.org/10.1039/c3ay40367j>
- Redeploying plant defences. (2020). *Nature Plants*, *6*(3). <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0628-0>
- Rincón, C. T. S., Gómez, G. L. C., & Montoya, J. E. Z. (2016). Extraction of phenolic compounds and antioxidant activity from leaves of *Bixa orellana* L. (achiote). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, *21*(2).
- Wrona, M., Bentayeb, K., & Nerín, C. (2015). A novel active packaging for extending the shelf-life of fresh mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Food Control*, *54*, 200–207. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.008>
- Wrona, M., Nerín, C., Alfonso, M. J., & Caballero, M. Á. (2017). Antioxidant packaging with encapsulated green tea for fresh minced meat. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *41*(2017), 307–313. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.04.001>
- Zheng, G. Q. (1994). Cytotoxic terpenoids and flavonoids from *Artemisia annua*. *Planta Medica*, *60*(1). <https://doi.org/10.1055/s-2006-959408>