

Universidad Pública de Navarra

Nafarroako Unibertsitate Publikoa

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE  
INGENIEROS AGRÓNOMOS

NEKAZARITZAKO INGENIARIEN GOI  
MAILAKO ESKOLA TEKNIKOA

ESTUDIO Y EVALUACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS  
FENÓLICOS DE HINOJO MARINO (*Crtihmum maritimum*)

presentado por

NATALIA CORTÉS LAINEZ (*e*)*k*

aurkeztua

INNOVACIÓN EN PROCESOS Y PRODUCTOS ALIMENTARIOS  
GRADUA ELIKAGAI PROZESU ETA PRODUKTUEN BERRIKUNTZAN

Junio, 2017 / 2017, ekaina



## RESUMEN

El objetivo del presente Trabajo de Fin de Grado fue obtener y estudiar extractos del hinojo marino (*Crithmum maritimum*). Para ello se puso a punto el método de extracción, del cual se analizaron dos métodos de secado (aire caliente y liofilización) y dos tipos de solventes polares con diferentes proporciones de etanol: agua (75:25 y 50:50). Fue necesario un estudio previo de las condiciones de ambos tipos de secado, para obtener la humedad deseada (5-10 %) en las plantas de hinojo marino. Por otra parte, se realizaron dos pruebas para determinar la calidad de los extractos: método de Folin-Ciocaltau para determinar la cantidad de polifenoles y DPPH para medir la capacidad antioxidante. Se comprobó que una mayor proporción de etanol: agua en la extracción aumentó tanto la cantidad de polifenoles extraídos como la capacidad antioxidante. También se confirmó que al aumentar la temperatura de secado estos valores disminuyen, siendo la muestra liofilizada y extraída con 75:25 etanol: agua, la que mejores resultados presentó tanto en la cantidad de polifenoles, como en la capacidad antioxidante. Se demostró que el secado convencional es muy inestable, ya que las muestras presentaron valores muy heterogéneos en sus resultados, debido a que no hubo homogeneidad en el secado dentro de la estufa.

*Palabras clave: hinojo marino, secado por aire caliente, liofilización, extracción, polifenoles, capacidad antioxidante.*

## **ABSTRACT**

The aim of this Final Degree Project is to obtain and study extracts of marine fennel (*Crithmum maritimum*). In order to achieve it, the extraction method was improved, in which two drying methods (hot air and lyophilization) and two types of solvents polar with different proportions of ethanol: water (75:25 and 50:50) were analysed

It was necessary a preliminar study of both types of drying methods for obtaining final conditions of humidity (5-10%) in the marine fennel plants. On the other hand two trails were performed to determine the extraction quality: Folin-Ciocaltau method to determine the quantity of polyphenols and DPPH to measure the antioxidant property. It was checked that a higher ethanol:water proportion in the extraction not only rise up polyphenols quantity, but also the antioxidant property. It also was confirmed that when drying temperature was risen the values are reduced, being the lyophilized and extracted with 75:25 ethanol: water sample the one that best results presented, not only in the or polyphenols present but also in the antioxidant capacity. It was demonstrated that the conventional drying method is very unstable, because of the fact that the trails presented very heterogeneous values in their results, due to the lack of homogeneity in the drying inside the stove.

**Key words:** marine fennel, drying for warm air, lyophilization, extraction, polyphenols, antioxidant property.

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Hinojo marino ( <i>Crithmum maritimum</i> ).....	1
1.2. Compuestos fenólicos .....	2
1.2.1. Estructura y clasificación.....	2
1.3. Antioxidantes en los alimentos .....	3
1.4. Secado de los alimentos .....	4
1.4.1. Efecto del tratamiento térmico sobre antioxidantes .....	6
2. OBJETIVOS .....	7
2.1. Diseño experimental .....	7
3. MATERIALES Y EQUIPOS .....	9
4. MÉTODOS .....	10
4.1. Diagrama de flujo .....	10
4.2. Métodos de secado .....	11
4.2.1. Secado convencional .....	11
4.2.2. Liofilización (de extracción) .....	13
4.3. Método de extracción.....	15
4.4. Medida del color .....	19
4.5. Método de Folin-Ciocaltau .....	19
4.5.1. Puesta a punto.....	21
4.6. Método DPPH.....	22
4.6.1. Puesta a punto.....	23
4.7. Análisis de datos .....	24
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	25
5.1. Rendimiento de la extracción.....	25
5.2. Color <sup>27</sup>	
5.3. Concentración de polifenoles.....	31
5.4. Capacidad antioxidante .....	34
6. CONCLUSIONES .....	37

7. BIBLIOGRAFÍA .....	38
ANEXOS .....	40
Tabla 11: Anova del parámetro L* .....	40
Tabla 12: Anova del parámetro a* .....	40
Tabla 13: Anova del parámetro b* .....	41
Tabla 14: Anova de la concentración de polifenoles .....	41
Tabla 15: Anova de la capacidad antioxidante .....	42

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Hinojo marino (*Crithmum maritimum*).

El hinojo marino (*C. maritimum*), es conocido también como cresta marina, perejil marino, ña de perro, cenoyo de mar. Pertenece a la familia de las *Apiaceae*. Se trata de una planta halófila costera, es decir, crece en ambientes salinos, y es resistente a la sequía, por lo que es capaz de crecer en ambientes calurosos, y en suelos pobres en nitrógeno, ligeramente ácidos y de pH entre 5 y 7.5. Su hábitat natural son zonas costeras, terrenos rocosos, como acantilados, y terrenos arenosos, siempre y cuando estas zonas sean alcanzadas por el agua del mar (Figura 1 y 2). Se distribuye a lo largo de las costas del Mediterráneo y del Mar Negro, así como a lo largo de la costa atlántica de Portugal y del sur y suroeste de Inglaterra, Gales e Irlanda del Sur. Se le han atribuido muchos intereses en la medicina popular, incluyendo propiedades diuréticas, antiescorbúticas, digestivas y purgativas.



Figura 1. Hinojo marino en grietas rocosas.  
Fuente: (Renna et al., 2017).



Figura 2. Hinojo marino en su hábitat natural.  
Fuente: (Renna et al., 2017).

Se trata de una planta perenne altamente ramificada de hasta 30- 60cm de altura, la raíz es fuerte, gruesa y nudosa, y las hojas son carnosas (Cornara *et al.*, 2009). Las hojas son ricas en numerosos compuestos como la vitamina C, carotenoides y flavonoides. Los aceites que se extraen de estas hojas, presentan niveles elevados de ácidos grasos omega 3 y 6, los cuales tienen un papel muy importante en la regulación del metabolismo y efectos contra enfermedades coronarias. En peso seco, su porcentaje alcanza: 2.02 % (lípidos neutros), 0.57 % (glicolípidos), 0.26 % (fosfolípidos). En el fruto el porcentaje oscila entre: 78.6 % (ácido oleico), 4.8 % (ácido palmítico), 15.4 % (ácido linoleico). Esta composición muestra semejanzas con el aceite de oliva y la canola. Los minerales que se encuentran en su composición en mayor proporción son: iodo, bromo, fosfatos, calcio y azufre.(Atia *et al.*, 2011)

Existen muchas plantas que poseen características en su composición que pueden ser útiles para las industrias agroalimentarias. *C. maritimum* se ha mantenido durante mucho

tiempo como condimento en ensaladas, ya que presenta un sabor salado y ácido. Pero para que estas plantas puedan ser utilizadas, aprovechando así sus características, y se conviertan en alternativas importantes para las industrias agroalimentarias, es necesario un conocimiento más exhaustivo de sus propiedades fisicoquímicas, antioxidantes y nutricionales.

Según el artículo de Meot-Duros *et al.*, (2008), *C. maritimum* tiene una fuerte actividad antimicrobiana, sobre todo su parte apolar, con la cual se consiguió inhibir el crecimiento de 9 microorganismos: *Micrococcus luteus*, *Salmonella arizonae*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas marginalis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* y *Candida albicans*. La parte polar, en cambio consiguió inhibir el crecimiento de 4 bacterias: *S. arizonae*, *P. marginalis*, *Pseudomonas aureginosas* y *P. fluorescens*. Como se puede observar presenta una mayor inhibición contra bacterias Gram negativas. También presenta actividad antioxidante, debido a su alto contenido en polifenoles, siendo la planta que mayor concentración presentó en el estudio comparativo realizado con tres plantas halófilas: *Eryngium maritimum* L., *C. maritimum* L. y *Cakile marítima* Scop.

## **1.2. Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos, son uno de los grupos de micronutrientes que se encuentra presente en el reino vegetal y que forma parte de la dieta humana. Se pueden clasificar en fenoles, ácidos fenólicos y flavonoides. Estos compuestos son metabolitos secundarios de las plantas, que poseen diferentes estructuras químicas y propiedades. Su estudio es importante, porque suponen una fuente de antioxidantes, están implicadas en las propiedades sensoriales de los alimentos, tanto crudos como procesados, y aportan beneficios para la salud humana en el tratamiento y prevención del cáncer, enfermedades cardiovasculares, y otras enfermedades inflamatorias.

Los compuestos fenólicos son antioxidantes naturales que se encuentran en los alimentos, por lo que la elaboración de productos con un alto contenido en estos compuestos supone una reducción en la utilización de aditivos y conservantes, pudiendo englobarlos en alimentos funcionales. Este comportamiento antioxidante, está relacionado con la capacidad para quelar metales. (Porrás-Loaiza & López-Malo, 2009)

### **1.2.1. Estructura y clasificación**

Los tres grupos más importantes de los compuestos fenólicos son: los flavonoides, los ácidos fenólicos y los polifenoles. Estos compuestos se caracterizan por presentar un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilos, incluyendo a sus derivados funcionales. (Porrás & López-Malo, 2009). El fenol es el más simple de la familia de los fenoles, es un sólido cristalino incoloro, que se oscurece al contacto con la luz, su punto de fusión es de 41 °C y el de ebullición de 182 °C, es parcialmente soluble en agua y tiene un olor característico (Figura 3). (Acuña, 2006).



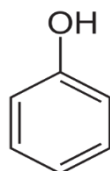


Figura 3. Estructura química del fenol

Los polifenoles son unos de los antioxidantes más potentes que se encuentran de forma naturales en hierbas, especias, plantas marinas, cereales y verduras. Evitan la oxidación de los radicales libres de los alimentos y su posterior transformación en hidroperóxidos, cuya descomposición produce componentes volátiles tales como alcanos, cetonas, alcoholes e hidrocarburos que provocan un sabor desagradable conocido como rancidez. (Porras-Loaiza & López-Malo, 2009)

### 1.3. Antioxidantes en los alimentos

Las reacciones de oxidación en los alimentos (ROS) se producen debido a las moléculas reactivas de oxígeno (ROS), tales como los radicales superóxido ( $O_2^-$ ), hidroxilo ( $OH^-$ ) y peróxilo ( $ROO^-$ ), los cuales se generan en una situación de estrés oxidativo. Las ROS desempeñan un papel importante en la patogénesis de diversas enfermedades graves, tales como trastornos neurodegenerativos, cáncer, enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, cataratas e inflamación. El proceso de oxidación es una de las vías más importantes para producir radicales libres en alimentos, fármacos e incluso sistemas vivos. (Özen, 2010)

Los agentes antioxidantes son sustancias que se incorporan al envase para prevenir los procesos de oxidación lipídica, sobre todos de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), que son los que poseen mayor interés desde el punto de vista nutricional, y así aumentar la estabilidad de los alimentos. También mantienen el color original, al prevenir la oxidación enzimática. Los agentes antioxidantes incorporados al envase actúan de diferentes formas: detienen la reacción de oxidación en cadena, eliminan el oxígeno que pueda contener el envase o el producto y los minerales como el cobre o el hierro, los cuales facilitan que se produzca la reacción.

Hay dos categorías básicas de antioxidantes: 1) sintéticos: son compuestos con estructuras fenólicas de diversos grados de sustitución de alquilo y 2) naturales: son compuestos fenólicos (tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos), compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de clorofila, aminoácidos y aminas) o carotenoides, así como el ácido ascórbico.

Entre los antioxidantes sintéticos los más utilizados son: el BHA (butilhidroxianisol) y el BHT (butilhidroxitolueno) (Figura 4). Son de naturaleza fenólica, muy efectivos, con un bajo costo y alta estabilidad. Algunos de los efectos demostrados de estos antioxidantes son: aumento del gasto energético con hipertrofia del tiroides en cerdos y ratas sometidos a diferentes concentraciones de BHT, hipertrofia hepática, necrosis de células alveolares del pulmón en ratones, provocadas por un metabolito de BHT y descenso anormal de la

protrombina en la sangre en ratas provocadas por BHT, causando hemorragias. (Ibañez, F. *et al.*, 2003)

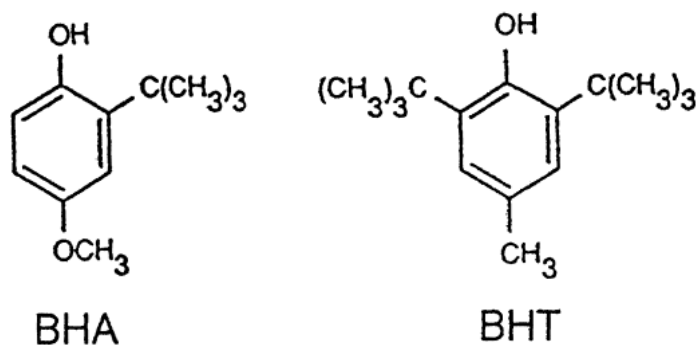


Figura 4. Fórmulas químicas de BHA y BHT (Karamac & Amarowicz, 1997)

Estos antioxidantes presentan restricciones en su uso, debido a su carcinogenicidad, lo que ha provocado un aumento en el interés de los antioxidantes naturales. Los extractos naturales de origen vegetal son alternativas a los conservantes sintéticos, además aportan propiedades bioactivas y un valor adicional a los productos finales. Algunos productos de panadería, productos lácteos y cárnicos ya han sido desarrollados incorporando extractos naturales de plantas aromáticas, especias y polvo de frutas, con fines antioxidantes. En particular, los extractos acuosos preparados a partir de hinojo y manzanilla fueron incorporados como antioxidantes naturales y antimicrobianos para el queso cottage y yogures, siendo las propiedades atribuidas a los compuestos fenólicos. (Caleja *et al.*, 2017).

#### 1.4. Secado de los alimentos

La presencia de agua en los alimentos favorece su deterioro, por lo que su disminución reduce las posibilidades de su alteración biológica, y de otros mecanismos de deterioro. El objetivo principal de disminuir la cantidad de agua es el aumento de la vida útil, pero también se produce una reducción en su peso, lo que favorece la manipulación, almacenamiento y transporte. La eliminación del agua en un alimento también presenta problemas como son: la alteración de la calidad nutricional y organoléptica. Al eliminar parte de agua de un alimento también conseguimos una reducción de la actividad de agua ( $a_w$ ), que es al agua disponible en un alimento para participar en reacciones físicas, químicas y microbiológicas, y se expresa como la relación entre la presión parcial de agua en el alimento ( $p$ ) y la presión de vapor del agua pura ( $p_o$ ) a la misma temperatura (1):

$$(1) \quad a_w = \frac{p}{p_o}$$

Como muestra la Figura 5, conforme se reduce la  $a_w$ , el alimento se mantiene más estable.

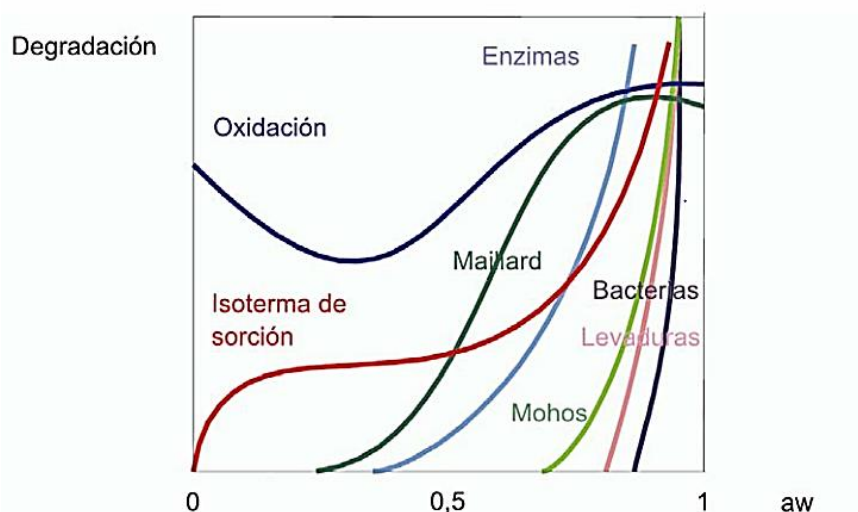


Figura 5. Reacciones producidas en el alimento según la  $a_w$ . Fuente: Casp A., Abril J., (2003)

En este trabajo se estudiaron dos métodos de secado:

- Secado con corriente de aire caliente: es uno de los métodos de secado más simples que existen, en donde el producto es colocado en una serie de bandejas, por las cuales circula aire caliente movido con ayuda de ventiladores. El agua del alimento se elimina debido a la diferencia entre la humedad relativa del producto y la del aire circundante. El secado ocurre en 4 etapas:
  - Transmisión de calor desde el aire hasta la superficie del producto.
  - Transmisión de calor desde la interfase sólido-gas hasta el interior del producto.
  - Transmisión de materia a través del producto.
  - Transferencia de vapor desde la interfase sólido-gas hacia el aire de secado.

Este tipo de secado utiliza temperaturas altas que modifican el aspecto y textura del producto, además se destruyen sustancias sensibles al calor perdiendo calidad.

- Liofilización: es un proceso de secado que consiste en sublimar el agua de un producto congelado, es decir, esta pasa de estado sólido a vapor directamente. Presenta una serie de ventajas respecto a otros métodos de secado: la estructura del alimento se mantiene mejor, la retención de aromas y nutrientes es mayor, por lo que la calidad es superior. La liofilización solo puede conseguirse si la temperatura y presión parcial de vapor de agua (hielo) son inferiores a las del punto triple del agua (Figura 6). Este valor hace referencia al agua pura, en los alimentos no hay agua pura, si no disoluciones con más o menos sólidos disueltos, por lo que este punto triple tiene a desplazarse a temperaturas más bajas.

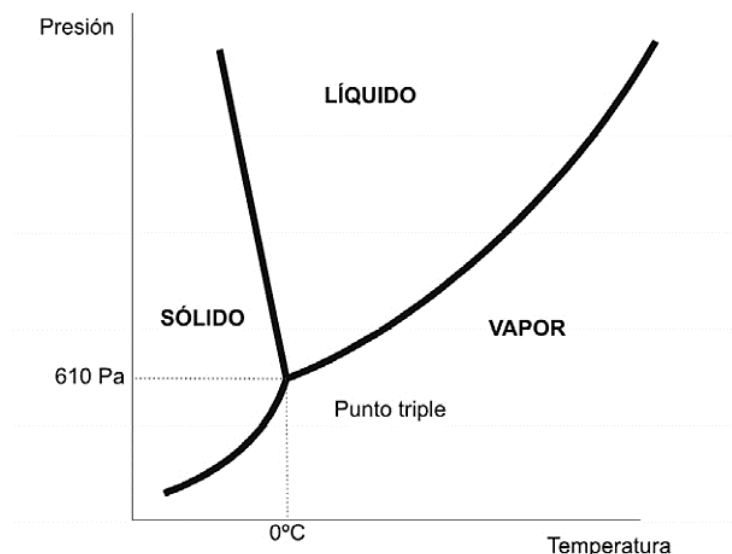


Figura 6. Punto triple del agua. Fuente: Casp A., Abril J., (2003)

La liofilización se realiza en tres fases:

1. Precongelación hasta la temperatura donde el producto está totalmente sólido,  $< 0^{\circ}\text{C}$
2. Sublimación, en donde se elimina alrededor del 90 % del agua, debido a la eliminación del hielo libre
3. Desorción en donde se elimina un 10 % perteneciente al agua ligada. En esta fase se realiza una vaporización a vacío a temperaturas entre  $20\text{-}60^{\circ}\text{C}$ . (Casp A., Abril J., 2003)

#### 1.4.1. Efecto del tratamiento térmico sobre antioxidantes

Según Tummanichanont *et al.*, (2017) uno de los componentes que se pueden ver afectados por el tratamiento de secado son los antioxidantes. En este artículo se demuestra que el secado por aire caliente es el que peor resultados se obtiene en cuanto a cantidad de polifenoles, en cambio el secado por liofilización, muestra el resultado más elevado.

Este trabajo se centró en extracciones polares de hinojo marino, mediante etanol: agua a diferentes concentraciones, con la finalidad de observar diferencias cuantificables en la cantidad de polifenoles medida con el método Folin-Ciocaltau. También se estudiaron dos tipos de secado diferentes, realizados previamente a las extracciones, ya que la planta se obtuvo en fresco. Estos métodos fueron secados por aire caliente (convencional) y liofilización. Por último, se cuantificó la actividad antioxidante mediante el método DPPH.

## 2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es poner a punto la metodología de extracción de componentes con potencial antioxidante y antimicrobiano de plantas halófilas (*C. maritimum*). También se determinó el contenido en polifenoles y la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos.

Por tanto se plantearon dos objetivos específicos:

*Objetivo específico 1:* optimizar la metodología de extracción.

*Objetivo específico 2:* determinar el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante de los extractos.

### 2.1. Diseño experimental

Dos métodos de secado, y dos tipos de extracción fueron evaluados, para el efecto se realizaron 4 réplicas de cada uno, obteniéndose un total de 16 muestras. El diseño experimental se realizó de la siguiente forma (Figura 7):

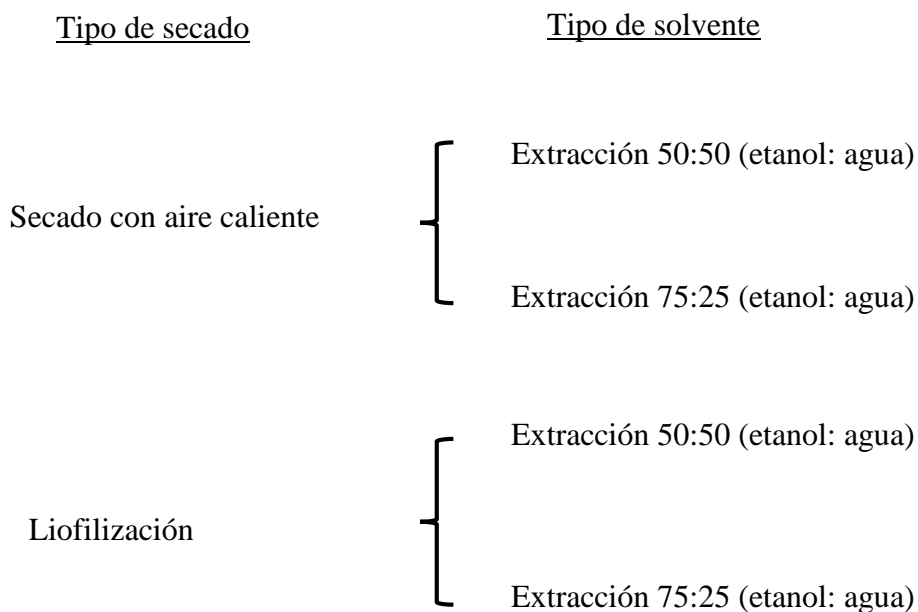


Figura 7. Diseño experimental

De cada replica se estudió y se evaluó lo siguiente:

- Condiciones de secado
- Rendimiento de la extracción
- Color
- Cantidad de polifenoles, por el método Folin-Ciocaltau
- Capacidad antioxidante, por el método DPPH

### 3. MATERIALES Y EQUIPOS

Los materiales y equipos utilizados fueron los siguientes:

- En el secado
  - Balanza humedad ST-H50 gram
  - Medidor de  $A_w$  novasina ms1
  - Liofilizador semiindustrial Lyobeta 25
  - Estufa con ventilación
  - Licuadora
  - Campanas desecadoras
  - Sales de silicagel
  - Etanol absoluto OPPAC
  - Nitrógeno líquido
  
- En la extracción:
  - Ultraturrax T25 IKA
  - Rotavapor Bucho R-200
  - Ultrasonidos UP400S hielscher
  - Centrifugadora Sigma 3k30
  - Etanol absoluto OPPAC
  
- En las pruebas
  - Digieye Verivide
  - Espectofotómetro multiplacas multiskan
  - DPPH Sigma-Aldrich
  - Reactivo Folin-ciocaltau Sigma-Aldrich
  - Espectofotómetro UH5300 Hitachi
  
- La materia prima fue Hinojo marino (*C. maritimum*), enviada desde A Coruña, en dos paquetes de 5 kg cada uno, embalados en cajas térmicas y en refrigeración. En la universidad fueron almacenados a 4 °C hasta su utilización.

## 4. MÉTODOS

### 4.1. Diagrama de flujo

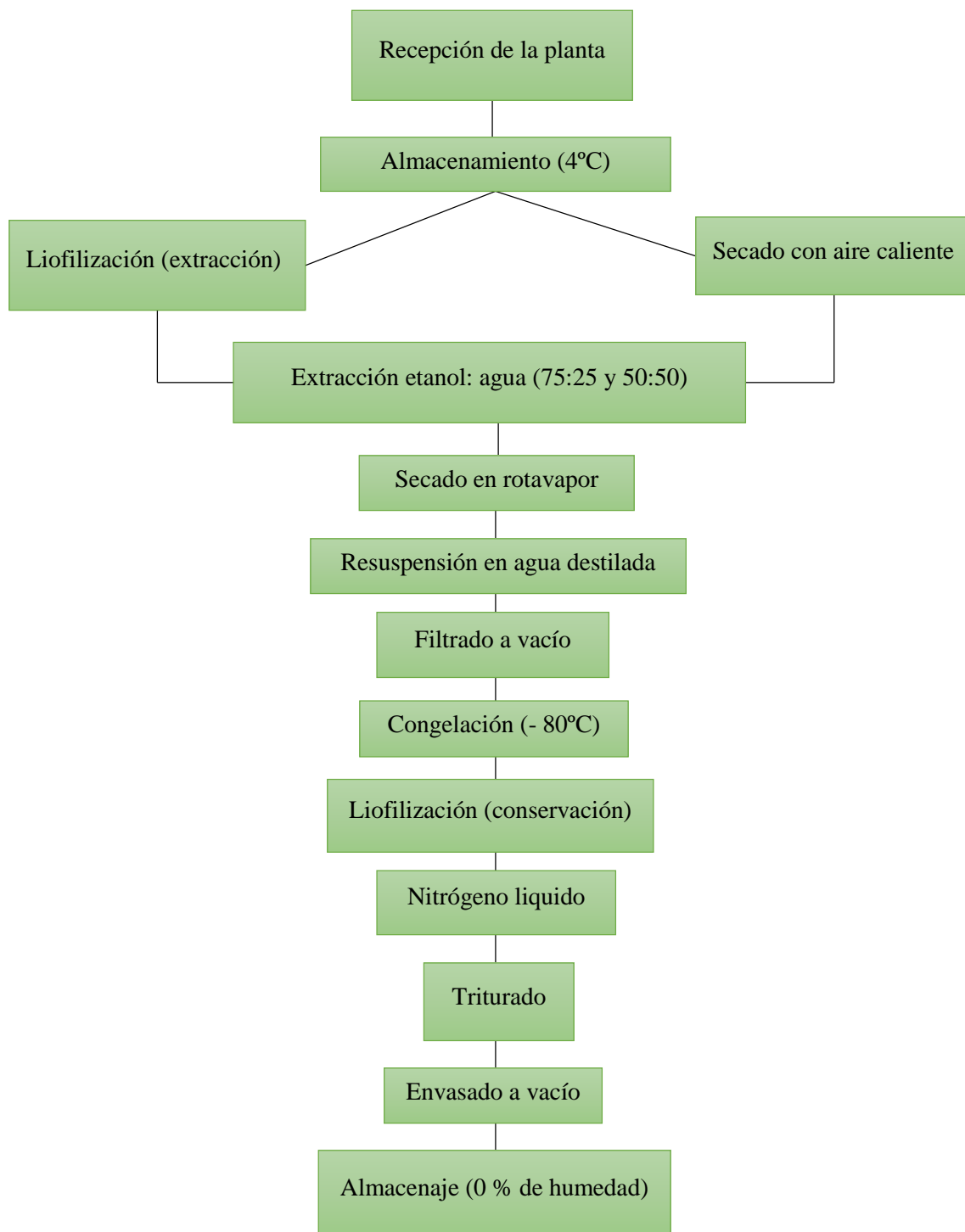


Figura 8. Pasos llevados a cabo hasta la obtención de los diferentes extractos de hinojo marino.



## 4.2. Métodos de secado

Se evaluaron dos métodos de secado de las plantas de hinojo marino:

- Secado con ventilación con aire caliente (convencional)
- Liofilización

### 4.2.1. Secado convencional

El secado convencional es más agresivo al alcanzarse temperaturas altas, pudiendo perder componentes durante el proceso de secado, e incluso polifenoles debido a que su temperatura de fusión es de 41 °C (Acuña, 2006). Las plantas de hinojo marino se obtuvieron en fresco (Figura 9) y su secado se realizó en una estufa equipada con ventiladores, para homogeneizar el aire circundante (Figura 10). La temperatura de secado fue de 55 °C (Pérez-Jiménez, J., & Saura-Calixto, F. 2015) y después de varias pruebas preliminares se estableció el tiempo de secado, el cual fue de 10 horas. Una vez secas las plantas, se trituraron y guardaron a vacío en una campana al 0 % de humedad (Figura 11, 12 y 13).



*Figura 9. Hinojo marino fresco*



*Figura 10. Hinojo marino en la estufa a 55°C*



Figura 11. Hinojo seco tras 10 horas en la estufa a 55 °C



Figura 12. Hinojo marino triturado y envasado al vacío



Figura 13. Campana al 0% de humedad

### Puesta a punto

Se realizaron pruebas preliminares, con el objetivo de alcanzar la humedad relativa deseada (5-10 %), ya que una humedad inferior podía influir negativamente en el rendimiento de los compuestos fenólicos. La primera prueba realizada, fue secar en la estufa el hinojo marino durante 24 horas a 55 °C, y medir la humedad relativa una vez transcurrido este tiempo. Como se observa en la Tabla 1, el secado fue excesivo, por lo que se realizó otro secado controlando la humedad relativa del hinojo marino con mayor frecuencia. Como muestra la Figura 14, el tiempo necesario para obtener la humedad relativa dentro del rango 5-10 % fueron 10 horas de secado a 55°C.

Tabla 1. Humedad del hinojo marino tras 24 horas de secado en la estufa a 55 °C.

Humedad (%)	Hinojo fresco	24 horas de secado en horno
<b>Media</b>	75 ± 8	0,61 ± 0,11
<b>CV (%)</b>	0,11	0,18

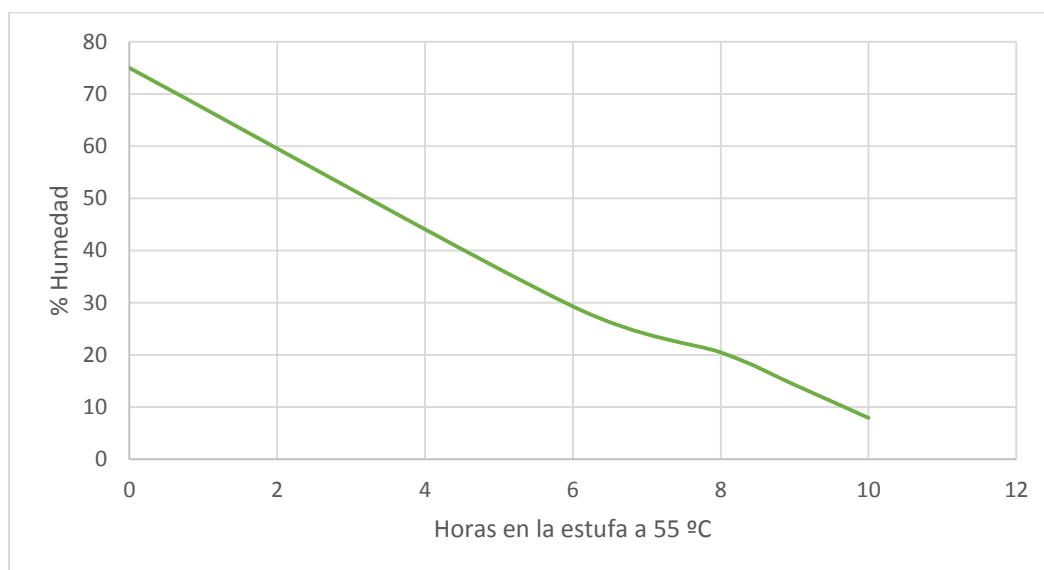


Figura 14. Evolución de la humedad durante el proceso de secado del hinojo marino en la estufa durante 10 horas

#### 4.2.2. Liofilización (de extracción)

El proceso de liofilización consiste en eliminar el agua de un alimento por congelación y posterior sublimación del hielo en condiciones de vacío. Al no elevarse la temperatura los componentes del alimento no se degradan, por lo que se producen menos pérdidas de sus componentes y se mantienen mejor las características organolépticas (color, textura y sabor).

##### Puesta a punto

Inicialmente se introdujeron las plantas de hinojo marino en fresco y a temperatura ambiente. Tras realizar la liofilización los valores de humedad conseguidos fueron muy elevados (Tabla 2), ya que todas las plantas no estaban en contacto con la base de la bandeja del liofilizador, lugar por donde se transmite el frío, por lo que la humedad de las plantas fue muy heterogénea. Tras este ensayo se decidió congelar las plantas de hinojo con nitrógeno líquido y romperlas con ayuda de un mortero, disminuyendo así su tamaño, y favoreciendo la transmisión de frío (Figura 15, 16, 17 y 18), consiguiendo así la humedad deseada (5-10 %) (Tabla 3).

Tabla 2. Humedad del hinojo marino liofilizado

Humedad (%)	Hinojo fresco	Liofilizado
Media	$75 \pm 8$	$31,2 \pm 20$
CV (%)	0,11	0,63

Tabla 3. Humedad y  $a_w$  del hinojo marino congelado con nitrógeno líquido y liofilizado

	Humedad	$a_w$
Media	$9,0 \pm 0,9$	$0,299 \pm 0,018$
CV (%)	10	6



Figura 15. Hinojo marino preparado para ser congelado con nitrógeno líquido

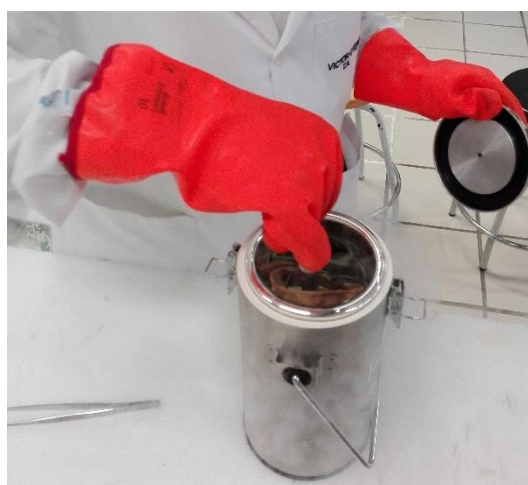


Figura 16. Congelación del hinojo marino con nitrógeno líquido



Figura 17. Hinojo marino congelado con nitrógeno líquido y triturado



Figura 18. Liofilizador semiindustrial Lyobeta 25

Los parámetros con los que se realizó la liofilización fueron los siguientes:

- Primera etapa:
  - Se bajó la temperatura a  $-45^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas
  - Se disminuyó la presión hasta 0.25 mbar, manteniendo la temperatura a  $-45^{\circ}\text{C}$ , durante 11 horas
- Segunda etapa:
  - Se subió la temperatura a  $25^{\circ}\text{C}$  durante 11 horas.

### 4.3. Método de extracción

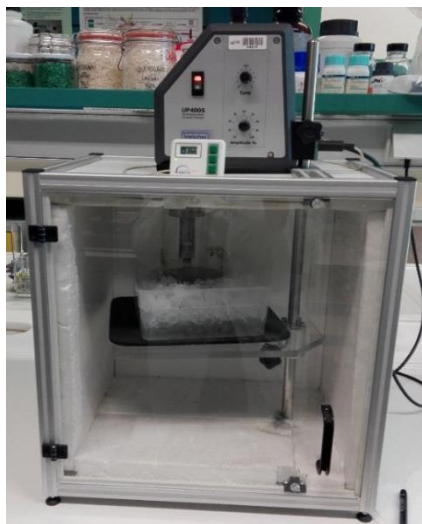
El método utilizado se basó en el descrito por Pérez-Jiménez, J., & Saura-Calixto, F. (2015), en el cual se realizaron modificaciones para alcanzar los resultados deseados.

- Tras secar la planta halófila por los métodos establecidos, se procedió al pesado de alrededor de 20 g, a los cuales se añadió 400 ml de etanol: agua, en las dos concentraciones establecidas 50:50 y 75:25.
- Las muestras se homogenizaron usando el ultraturrax (ultraturrax T25 IKA-WERKE) en la posición 5 (20500 rpm) durante 5 min. (Figura 19).



*Figura 19. Homogeneización del hinojo marino con el Ultraturrax T25 IKA-WERKE*

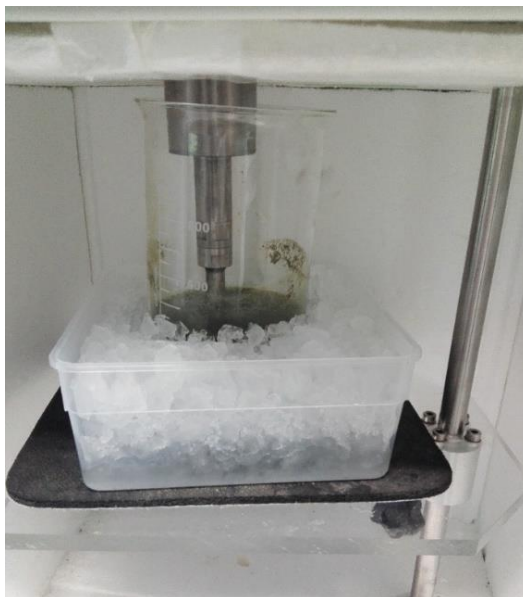
- Se realizó un segundo homogenizado por sonicación (UP 400 Hielscher Ultrasound Technology, Germany) utilizando una punta de 7 mm de diámetro se aplicó 8 ciclos de 2 min al 100 % de potencia, con un descanso de un minuto durante los ciclos. (Figura 20).



*Figura 20. Sonicación del hinojo marino con el Ultrasonidos UP 400 Hielscher Ultrasound Technology*

- Tanto en la fase del ultraturrax, como en la de ultrasonidos se colocó la muestra en hielo, para evitar el aumento de la temperatura por encima de 41 °C, que es la temperatura de fusión de los polifenoles, evitando así su degradación (Figura 21). Como se observa en la Tabla 4, se anotó la

temperatura alcanzada de las muestras que superaron los 41 °C, para observar posibles alteraciones en cuanto a los polifenoles. (Tabla 4).



*Figura 21. Colocación de hielo durante la homogenización por ultrasonidos del extracto de hinojo marino para evitar el aumento de temperatura*

*Tabla 4. Control de la temperatura de los extractos de hinojo marino tras los ultrasonidos.*

<b>Muestra</b>	<b>Secado</b>	<b>Etanol:agua</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
<b>3.1</b>	Liofilizado	50:50	43.4
<b>3.3</b>	Liofilizado	50:50	46.3
<b>4.1</b>	Liofilizado	75:25	40.3
<b>4.3</b>	Liofilizado	75:25	43
<b>4.4</b>	Liofilizado	75:25	40.4

- El extracto fue dividido en 8 alícuotas equilibradas y se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos a una temperatura de 5 °C
- El sobrenadante fue vertido en un matraz de fondo redondo y secado en rotavapor (Rotavapor Buchi R-200, acoplado a módulos de vacío V-805 y V- 500). Se fijó la temperatura del baño a 35 °C, con agua fría para la refrigeración y la presión de vacío se estableció en 23 mbar, hasta conseguir la sequedad total. (Figura 22)

- Se resuspendió el contenido total con 30 ml de agua destilada
- Se filtró al vacío para eliminar las partículas en suspensión que podrían alterar los resultados. (Figura 23 y 24)



*Figura 22. Secado de los extractos de hinojo marino en el Rotavapor Buchi R-200, acoplado a módulos de vacío V-805*



*Figura 23. Filtrado a vacío de los extractos obtenidos del rotavapor tras resuspenderlos en 30 ml de agua destilada*



*Figura 24. Extracto con purezas (abajo) y filtrada a vacío (arriba)*



- Los extractos fueron congelados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Fueron liofilizados (de conservación) mediante dos etapas:
  - Primera etapa
    - Establecer durante 50 min una temperatura de  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$
    - Realizar el vacío hasta una presión de 0.016 mbar
    - Una vez alcanzada esta presión se mantuvo la temperatura a  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 23 horas y 30 minutos.
  - Segunda etapa:
    - Se elevó la temperatura a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante una hora con una presión de 0.016 mbar.
    - Se mantuvo esta temperatura y presión durante 23 horas.
    - Para alcanzar estos parámetros de liofilizado, fueron necesarios muchos ensayos previos, ya que las muestras quedaban con una alta humedad y una textura pegajosa.
- Una vez acabado el proceso de liofilización, se congelaron las muestras con nitrógeno líquido, se trituraron con un mortero, se colocaron en tubos estériles y fueron almacenadas en campanas desecadoras con 0 % humedad relativa. Este paso fue necesario, debido a que la pegajosidad de las muestras no permitía su separación del soporte ni su trituración sin congelarlas previamente. Esto se debió a que las muestras contenían agua en su composición (alrededor de un 4.4 %).

#### **4.4. Medida del color**

Una vez liofilizados los extractos de hinojo marino, estos presentaron diferencias de color según el tipo de secado y la proporción de etanol: agua, por lo que se realizó la medida del color en el Digieye. La medida se realizó por triplicado y con un círculo de 20 mm de diámetro. Los parámetros medidos por el Digieye fueron:  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ .

- $L^*$ : indica la luminosidad, cuanto mayor sea la medida más luminosidad presenta.
- $a^*$ : valores negativos indican verde mientras valores positivos indican rojo
- $b^*$ : valores negativos indican azul y valores positivos indican amarillo

#### **4.5. Método de Folin-Ciocaltau**

El método de Folin-Ciocaltau, se utiliza para determinar y cuantificar los fenoles totales presentes en un alimento o vegetal. Este método se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con el reactivo Folin-Ciocaltau, a pH básico usando carbonato sódico al 10 % como buffer, dando lugar a un color azul, el cual se mide por espectrofotometría a 750 nm, tras 120 minutos de incubación en la oscuridad. El reactivo contiene wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico, y reacciona con los fenoles presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico es de color amarillo, y al ser reducido por los

fenoles da lugar a un complejo de color azul intenso, esta intensidad es la que se mide mediante el espectrofotómetro para determinar la cantidad de fenoles. (Bobo-García *et al.*, 2015; García, Fernández, & Fuentes, 2015). Para determinar la cantidad de polifenoles se siguió el protocolo establecido por Bobo García (2015). Primero se programó el espectrofotómetro multiplacas multiskan go con los parámetros deseados, y se prepararon las disoluciones necesarias (Figura 25):

- Carbonato sódico al 10 %: se disolvieron 10 g en 100 ml de agua, como es una reacción exotérmica, se dejó enfriar y se enrasó.
- Reactivo Folin-Ciocaltau 1:4 (Folin: agua)

Los blancos fueron los siguientes:

- Blanco (B): 195  $\mu$ l de agua destilada
- Blanco reactivo (BR): 20  $\mu$ l agua + 100  $\mu$ l Folin (1:4) + 75  $\mu$ l carbonato sódico (10 %)
- Blanco muestra (BM): 20  $\mu$ l muestra + 175  $\mu$ l de agua. Este blanco se realizará siempre que el color de la muestra influya en los resultados. A la longitud de onda en la que se realiza el análisis 750 nm, los colores amarillos, verdosos o azules, pueden dar errores.

Los promedios de los blancos se restaron a todas las demás placas.

A continuación, en una placa de 96 pocillos (400  $\mu$ l) de fondo plano se añadió:

- El agua destilada en los pocillos que corresponda (blanco, blanco reactivo y blanco muestra)
- Después se añadió 20  $\mu$ l de muestra, incluidos los blancos muestra.
- Adición de 100  $\mu$ l de Folin (1:4) en los pocillos correspondientes a la muestra y blanco reactivo.
- Agitación durante 1 minuto + 4 minutos de incubación a 25 °C
- Adición de 75  $\mu$ l de carbonato sódico al 10 %
- Agitación de 1 min
- Incubación en la oscuridad durante 2 horas.
- Medición a 750 nm



Figura 25. Espectrofotómetro multiplacas multiskan go

#### 4.5.1. Puesta a punto

Se realizó una recta de calibrado, con diferentes disoluciones de ácido gálico: 10, 20, 50, 100 y 200 mg/L. Con ello se obtuvo la ecuación de la recta, con una correlación de 0.9996 (Figura 26). Esta curva de calibrado es necesaria realizarla cada vez que se cambia de lote.

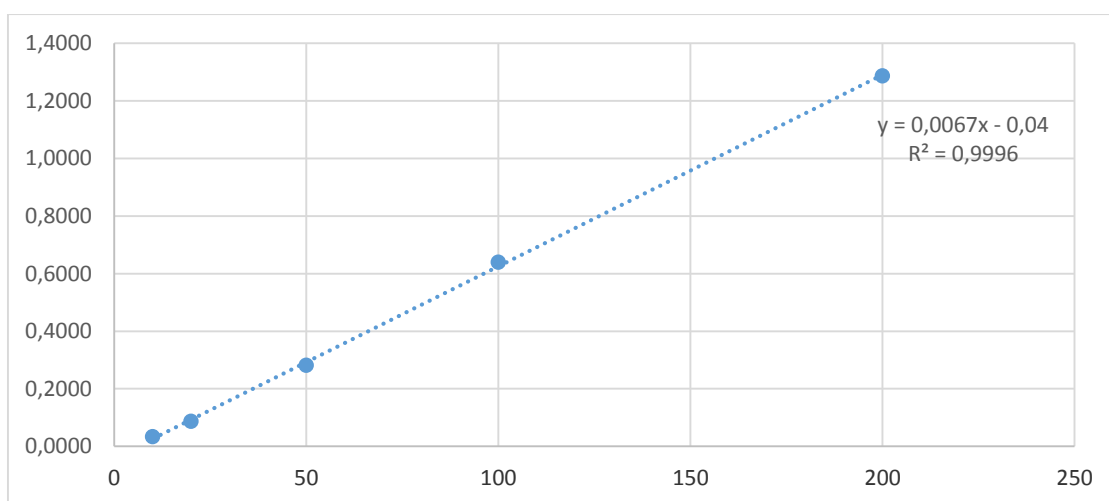


Figura 26. Curva de calibrado del método Folin-Ciocaltau

Con la ecuación de la recta se calculó la cantidad de polifenoles de las muestras a analizar. El total de polifenoles se calculó como mg de ácido gálico/ g de extracto seco.

Se realizaron pruebas para determinar la concentración a la que debía estar la muestra disuelta en agua, para que el resultado se encontrase en el rango de la recta de calibrado entre 20-70 mg de ácido gálico/L, ya que es en estos valores donde el resultado es más fiable (Bobo-García *et al.*, 2015). Como se observa en la Tabla 5, la concentración que se encuentra dentro del rango 20-70 mg de ácido gálico/L, es la correspondiente al 0,5 %, por lo que todas las muestras que se analizaron se hicieron a esta concentración, para ello se pesó 0.125 mg de muestra y se enrasó en 25 ml de agua destilada.

Tabla 5. Pruebas iniciales de Folin para determinar la concentración de las muestras, para que estas se encuentren en la concentración de 20-70 mg de ácido gálico/L

	M 2 %	M 1%	M 0,5 %
<b>Media de las absorbancias</b>	1,332 ± 0,021	0,7710 ± 0,042	0,4178 ± 0,046
<b>CV (%)</b>	0,016	0,054	0,109
<b>mg de ác gálico/L</b>	177,484	86,760	<b>30,351</b>

#### 4.6. Método DPPH

La actividad antioxidante no se puede medir de forma directa, pero puede determinarse mediante un proceso de oxidación controlada, utilizando compuestos antioxidantes (J. Tovar del Río, 2013). La autooxidación es una reacción lenta que ocurre en tres pasos: inducción, propagación y terminación. Durante el periodo de inducción se forman los radicales alquilo (moléculas derivadas de los alcanos que han perdido un átomo de hidrogeno, quedándose un electrón desapareado), los cuales reaccionan con moléculas de oxígeno formando radicales hidroperóxidos y peróxidos durante la fase de propagación. En la fase de terminación se produce la asociación de dos radicales para formar una molécula estable. (Brand-Williams *et al.*, 1995)

Para medir la capacidad antioxidante se utiliza el método del radical libre DPPH<sup>•+</sup> (2,2-difenil-1-picril-hidroxilo) propuesto por Blois (1958). Este método se basa en la deslocalización del electrón desapareado. Esta deslocalización le otorga un color violeta, caracterizada por una banda de absorción en solución con metanol, medida a 515 nm. Por tanto, el método de DPPH<sup>•+</sup> está basado en la transferencia de electrones.

En el momento que la disolución de DPPH<sup>•+</sup> se pone en contacto con una sustancia capaz de donar un átomo de hidrogeno, se produce la formación reducida del DPPH<sup>•+</sup> la cual provoca una pérdida de color en la disolución, desapareciendo o disminuyendo el color violeta inicial, y por lo tanto la absorbancia disminuye. Este cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes. (J. Tovar del Río, 2013; Muñoz Juárez & Gutiérrez, 2004)

Para obtener los resultados se debe relacionar la absorbancia mediante la siguiente fórmula (2):

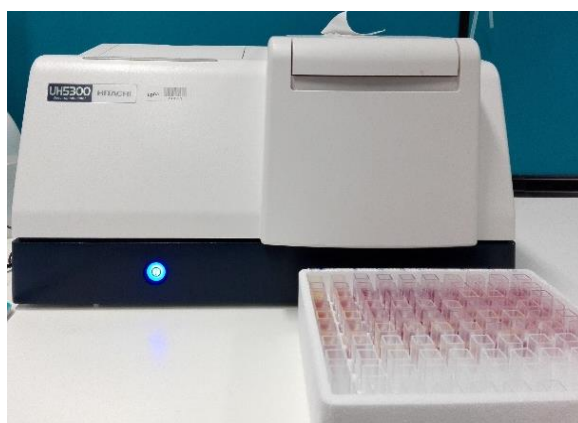
$$(2) \quad \% \text{ Inhibición} = \frac{Abs_{t=0} - Abs_{final}}{Abs_{t=0}} * 100$$

La actividad antioxidante se determina mediante el método descrito por Brand Williams *et al.*, (1994), donde se establece que la disolución DPPH<sup>+</sup> deber ser de 60 µM. Esta disolución se realizó mediante la adición de 0.0023 g del compuesto DPPH<sup>+</sup> a 100 ml de metanol. A continuación, se homogeniza la muestra hasta su total disolución, y se protege de la luz y del oxígeno para evitar su degradación. Para determinar la capacidad antioxidante de los diferentes extractos de hinojo marino, se añadió 60 µL de la disolución de hinojo marino a 2.940 µL de disolución DPPH<sup>+</sup> y se realizó la medida a 515 nm de longitud de onda en el espectrofotómetro, tras 40 min de incubación.

#### **4.6.1. Puesta a punto**

Para determinar el tiempo de reacción se realizaron tres cinéticas independientes que relacionan la absorbancia a 515 nm en el espectrofotómetro UH5300 HITACHI (Figura 27). con el tiempo de reacción establecido en el método propuesto por Brand-Williams (1995) para lecturas realizadas cada 5s. Las muestras seleccionadas para este ensayo se corresponden con las que se prevé que tengan mayor y menor actividad antioxidante (secada por liofilización, extraída con 75:25 de etanol: agua, y disuelta al 2 % en agua destilada; secado convencional 50:50 al 2 % y al 0.5%) en función de los ensayos de cuantificación de contenido en polifenoles totales

Como se observa en la Figura 28, no es conveniente acortar el tiempo de reacción contemplado en el método de Brand-Williams (1995) dado que la muestra correspondiente a hinojo marino secado por método convencional y extraído con etanol: agua al 50:50, y disuelto al 2 %, no es estable tras 60 min. La concentración elegida para analizar las muestras fue al 2 %, ya que esta mostró una buena caída en la cinética. Para ello se pesaron 0.5 g del extracto seco de hinojo y se enrasó en 25 ml de agua destilada.



*Figura 27. Espectrofotómetro UH5300 HITACHI*

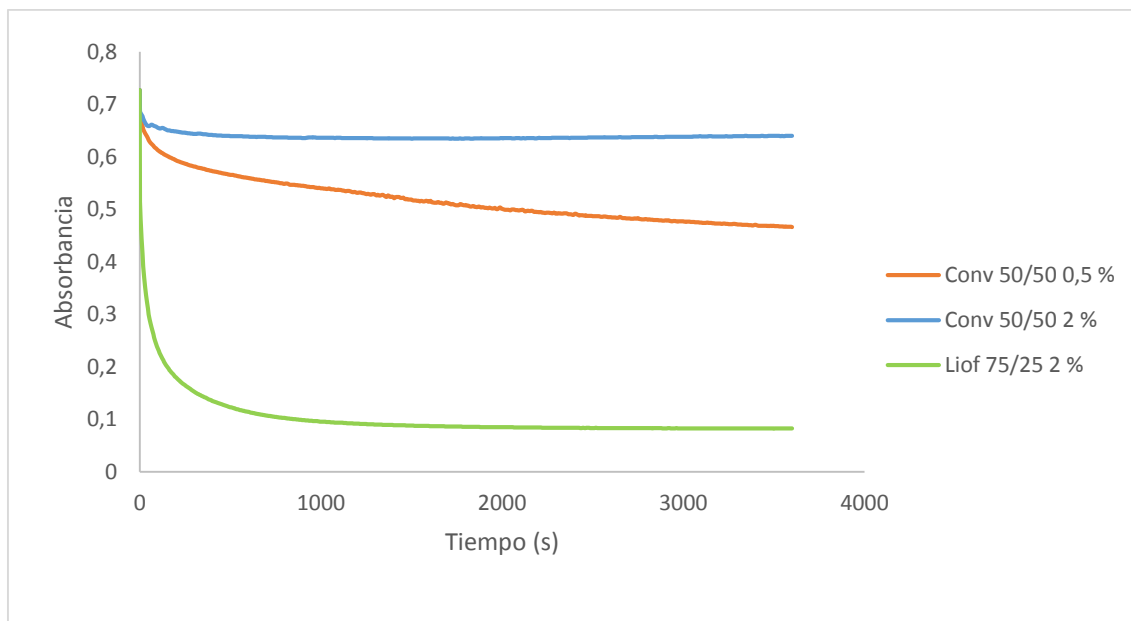


Figura 28. Curvas de cinética completas

#### 4.7. Análisis de datos

Los análisis estadísticos de los resultados se realizaron mediante el programa informático IBM SPSS Statistics 22.

A través del análisis estadístico se observaron presencia o ausencia de diferencia significativa entre el tipo de secado realizado y el método de extracción con la cantidad de polifenoles, la capacidad antioxidante y el color de los extractos.

Se aplica el análisis de varianza (ANOVA) simple con un nivel de significancia de 5% ( $p < 0,05$ ) para evaluar el efecto causado por un factor en cada una de las propiedades de estudio y sus posibles interacciones. También se realizan grupos homogéneos del factor estudiado mediante el método Duncan.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Rendimiento de la extracción

Se calculó el rendimiento de la extracción, pesando las muestras antes (Figura 29) y después de la liofilización (de conservación) (Figura 30). El rendimiento se calculó de la siguiente forma (3):

$$(3) \quad \text{Rendimiento} = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} * 100$$



Figura 29. Extracto antes de la liofilización



Figura 30. Extracto tras la liofilización

Como se observa en la Tabla 6, todas las muestras presentan un rendimiento de la extracción entre el 50-58%, esto se debe a que todas fueron tratadas con las mismas condiciones de secado en la liofilización. Las diferencias pueden deberse a absorciones de agua por parte del extracto, que presentaba una alta higroscopicidad.

Tabla 6. Datos del rendimiento de la extracción

	Muestras	Rendimiento (%)	Media	CV (%)
<b>Convencional 50:50 (etanol: agua)</b>	1,1	51,6	55,3 ± 3,3	6
	1,2	50,9		
	1,3	55,7		
	1,4	58,3		
	1,5	57,5		
	1,6	58,0		
<b>Convencional 75:25 (etanol: agua)</b>	2,1	55,3	57,3 ± 1,9	3
	2,2	56,7		
	2,3	59,9		
	2,4	57,1		
<b>Liofilizado 50:50 (etanol: agua)</b>	3,1	52,3	53,5 ± 0,8	1
	3,2	54,0		
	3,3	53,8		
	3,4	53,8		
<b>Liofilizado 75:25 (etanol: agua)</b>	4,1	55,0	54,5 ± 0,7	1
	4,2	55,1		
	4,3	54,0		
	4,4	53,8		



## 5.2. Color

La medida del color se realizó en el Digieye tal como se indica en materiales y métodos, ya que los extractos presentaron diferencias de color tras el liofilizado (Figuras 35, 36, 37 y 38).

Como se observa en las figuras 32, 33 y 34 todas las muestras presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en los tres parámetros analizados. Las muestras presentaron una luminosidad ( $L^*$ ) alta, siendo mayor en las muestras que se realizaron con un 75:25 de etanol: agua (Figura 32). En cuanto al parámetro  $a^*$  (Figura 33), la muestra correspondiente a secado por liofilización 75:25 es la que presenta los valores más elevados, por lo que su coloración es la más rojiza, como se puede comprobar en la Figura 41. Por último, en el parámetro  $b^*$  (figura 34) la muestra correspondiente a secado convencional 75:25 es la que mayor resultado presenta, por lo que su coloración fue la más amarilla, seguida de convencional y liofilizado 50:50 y por último liofilizado 75:25.

Estas diferencias que se observan en el color, es debido a los dos métodos de secado utilizados, ya que en el secado convencional las plantas de hinojo marino presentaron coloraciones marrones por una exposición prolongada al calor, en cambio aquellas que fueron liofilizadas mostraron una coloración más verdosa (Figura 31). Según el artículo de Renna *et al.*, (2017), en donde el hinojo marino fue secado a diferentes temperaturas, conforme esta aumentaba el color de las plantas se oscurecía. También influye la concentración de etanol: agua utilizada en la extracción, ya que de esta forma se obtuvieron compuestos diferentes en las extracciones, los cuales aportaron diferencias en el color.



Figura 31. Hinojo secado por método convencional (izquierda), liofilizado (derecha)

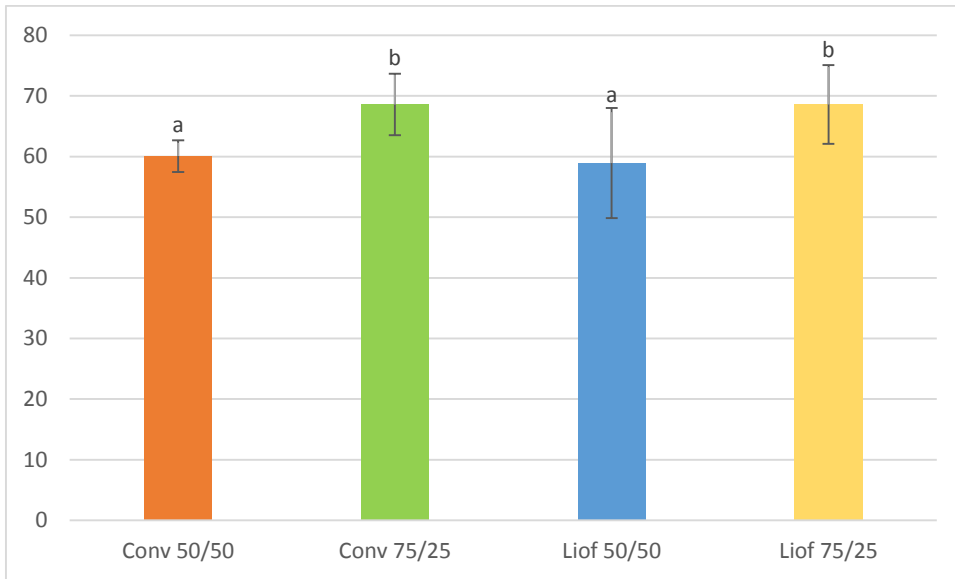


Figura 32. Medidas del parámetro  $L^*$  de extractos de hinojo marino secados por dos métodos (convencional y liofilización) y extraídos con diferentes proporciones de etanol: agua (50:50 y 75:25). Letras diferentes indican diferencia significativa entre las muestras para un nivel de significación del 95 %.

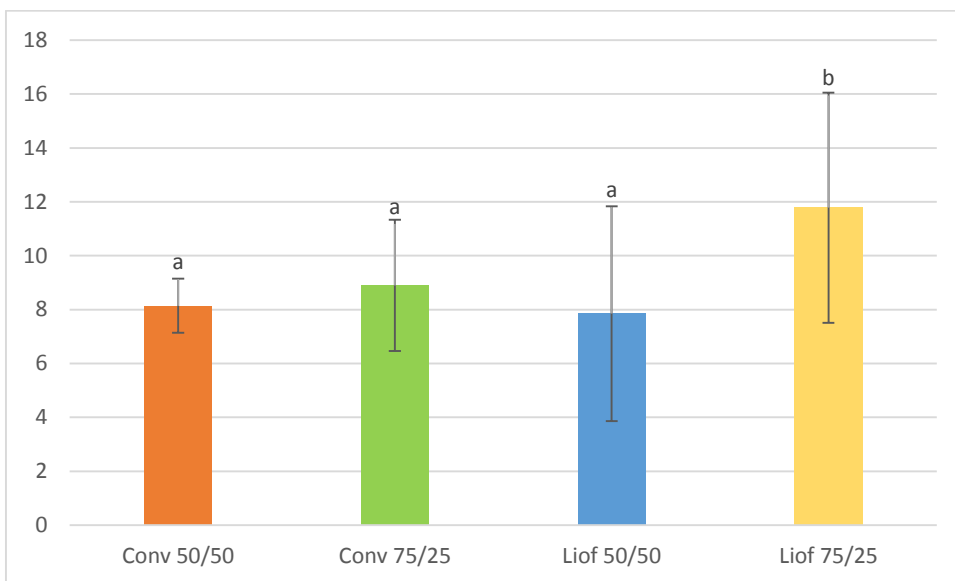


Figura 33. Medidas del parámetro  $a^*$  de extractos de hinojo marino secados por dos métodos (convencional y liofilización) y extraídos con diferentes proporciones de etanol: agua (50:50 y 75:25). Letras diferentes indican diferencia significativa entre las muestras para un nivel de significación del 95 %.

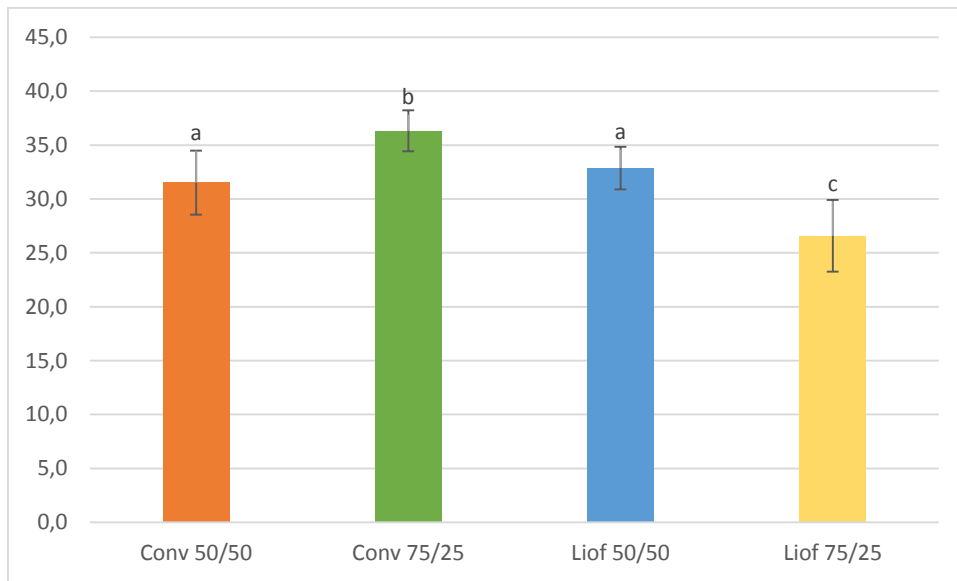


Figura 34. Medidas del parámetro  $b^*$  de extractos de hinojo marino secados por dos métodos (convencional y liofilización) y extraídos con diferentes proporciones de etanol: agua (50:50 y 75:25). Letras diferentes indican diferencia significativa entre las muestras para un nivel de significación del 95 %.



Figura 35. Aspecto de los extractos de hinojo marino tras un secado convencional y uso de un solvente etanol: agua (50:50)



*Figura 36. Aspecto de los extractos de hinojo marino tras un secado convencional y uso de un solvente etanol: agua (75:25)*



*Figura 37. Aspecto de los extractos de hinojo marino tras un secado por liofilización y uso de un solvente etanol: agua (50:50)*



*Figura 38. Aspecto de los extractos de hinojo marino tras un secado por liofilización y uso de un solvente etanol: agua (75:25)*

### **5.3. Concentración de polifenoles.**

Como se observa en las Tablas 7 y 8 los coeficientes de variación resultado de realizar el método Folin-Ciocaltau de las muestras secadas por el método convencional fueron muy elevados. En cambio, las muestras liofilizadas muestran CV más bajos, por lo que estas presentaron mayor homogeneidad (Tablas 9 y 10). Se decidió realizar otras dos extracciones al 50:50 de etanol: agua, y otras dos al 75:25 de hinojo marino secado por el método convencional. Tras analizarlas, se estudiaron todos los resultados junto con el tutor y se decidió eliminar los correspondiente a: 1.1, 1.2, 2.3 y 2.4, ya que presentaban valores muy elevados.

Tabla 7. Resultados del método Folin-Ciocaltau en las muestras secadas por el método convencional y extraídas con una proporción de etanol: agua de 50:50

<b>Conv 50:50</b>						
	<b>1,1*</b>	<b>1,2*</b>	<b>1,3</b>	<b>14</b>	<b>1,5</b>	<b>1,6</b>
<b>mg de ácido galico/g de extracto seco</b>	48,39	49,63	10,34	10,26	10,98	11,37
<b>Media total</b>	23,50 ± 19,77					
<b>CV (%)</b>	84					

\*Datos eliminados

Tabla 8. Resultados del método Folin-Ciocaltau en las muestras secadas por el método convencional y extraídas con una proporción de etanol: agua de 75:25

<b>Conv 75:25</b>						
	<b>2,1</b>	<b>2,2</b>	<b>2,3*</b>	<b>2,4*</b>	<b>2,5</b>	<b>2,6</b>
<b>mg ácido galico/g</b>	9,12	9,56	37,26	36,51	18,75	18,91
<b>Media total</b>	21,69 ± 12,52					
<b>CV (%)</b>	58					

\* Datos eliminados.

Tabla 9. Resultados del método Folin-Ciocaltau en las muestras secadas por liofilización y extraídas con 50:50 de etanol: agua.

<b>Liof 50:50</b>				
<b>Muestras</b>	<b>3.1</b>	<b>3.2</b>	<b>3.3</b>	<b>3.4</b>
<b>mg ácido gálico/g de extracto seco</b>	3,34	2,95	3,02	2,98
<b>Media total</b>	3.07 ± 0.18			
<b>CV (%)</b>	6			

Tabla 10. Resultados del método Folin-Ciocaltau en las muestras secadas por liofilización y extraídas con 75:25 de etanol: agua.

<b>Liof 75:25</b>				
<b>Muestras</b>	<b>4.1</b>	<b>4.2</b>	<b>4.3</b>	<b>4.4</b>
<b>mg ácido gálico/g de extracto seco</b>	4,44	5,00	3,84	4,33
<b>Media total</b>	$4.4 \pm 0.47$			
<b>CV (%)</b>	11			

Los resultados obtenidos después de la filtración se encuentran en la Tabla 11 y la Figura 39, donde se observan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las muestras. Aquellas que mayor cantidad de polifenoles presentan son las correspondientes a la extracción con 75:25 de etanol: agua, y la muestra secada por liofilización es la que mayor resultado muestra. Esto es debido a que al utilizar una mayor proporción de etanol se consiguió extraer más polifenoles. En cuanto a la temperatura, el proceso de liofilización deshidrata el producto a bajas temperaturas, por lo que no altera los componentes del alimento, en cambio un secado a 55 °C, reduce el nivel de polifenoles. Tal como se demuestra en el artículo Renna et al., (2017), conforme aumenta la temperatura de secado, algunos componentes del hinojo marino como son los aceites esenciales y las clorofilas disminuyen notablemente. Según Chen et al., (2017) y Tummanichanont et al., (2017), los cuales realizaron diferentes métodos de secado de la planta *Andrographis paniculata* y de moras, respectivamente, demostraron que aquellas que fueron liofilizadas presentaron mayor contenido en polifenoles, y conforme aumentaba la temperatura de secado, este contenido se iba reduciendo. En cuanto a la cantidad de polifenoles que presentan las muestras analizadas estas se encuentran dentro de los valores aceptados para *Crithmum maritimum* según el artículo de Jallali et al., (2012), donde las partes aéreas analizadas presentaron entre 4.1 y 14.1 mg de ácido gálico/ g de extracto seco. Por tanto la única muestra que supera estos valores es la realizada mediante secado por liofilización y extraída con un 75:25 de etanol: agua.

Tabla 11. Resultados finales del método Folin-Ciocaltau tras realizar la eliminación de los datos anómalos

Muestras	Conv 50:50	Conv 75:25	Liof 50:50	Liof 75:25
mg de ácido gálico/ g de extracto seco	10,74 ± 0,53 <sup>a</sup>	14,09 ± 5,48 <sup>b</sup>	12,33 ± 0,72 <sup>ab</sup>	17,61 ± 1,89 <sup>c</sup>
CV (%)	4,95	39	6	11

Diferente letra en misma fila indica diferencia significativa entre las muestras para un nivel de significación del 95 %.

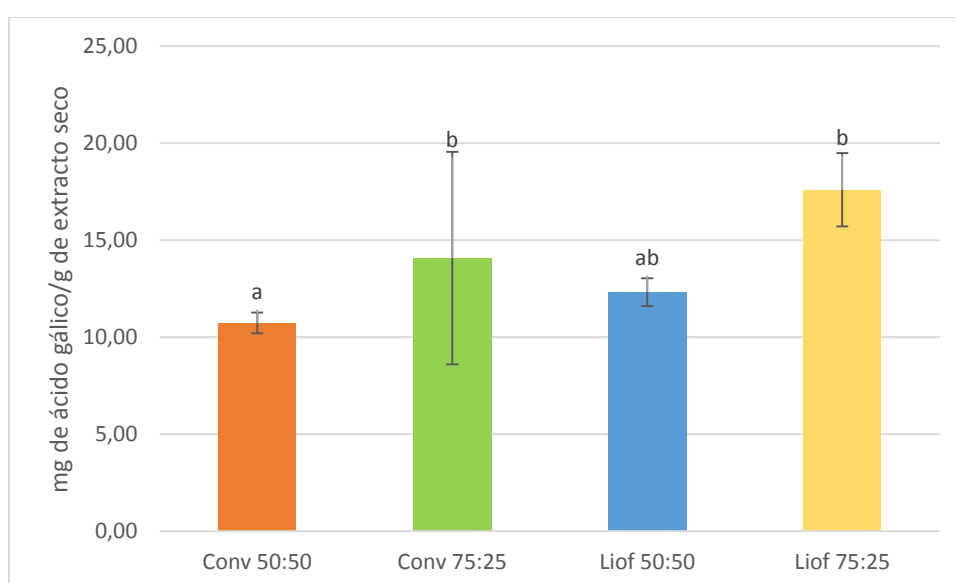


Figura 39. Concentración de polifenoles de las muestras, tras eliminar los datos erróneos. Letras diferentes indican diferencia significativa entre las muestras para un nivel de significación del 95 %.

#### 5.4. Capacidad antioxidante

En las Figuras 40 y 41 se puede observar los resultados de la capacidad antioxidante de las muestras según el método DPPH. Se observa que los resultados presentan diferencia significativa ( $p < 0.5$ ) y se asemejan a los del método Folin-Ciocaltau, presentando una mayor capacidad antioxidante las muestras extraídas con 75:25 de etanol:agua, dentro de estas el valor más alto lo presenta aquella cuyo secado se realizó por liofilización, siendo también la muestra más estable ya que su coeficiente de variación fue  $< 0,5$ . Las extraídas con 50:50 de etanol: agua presentan los valores más bajos, y las secadas por el método convencional muestra un coeficiente de variación elevado, presentando mucha heterogeneidad en los datos (Tabla 12). Según Generalić Mekinić et al., (2016) el porcentaje de inhibición de la especie *Crithmum maritimum* está en torno al 61 %, por lo que las muestras analizadas están dentro de la normalidad, la excepción más notable la



presenta la muestra correspondiente a secado por liofilización y extraída con un 75:25 de etanol:agua, que presentó un 90 % de inhibición.

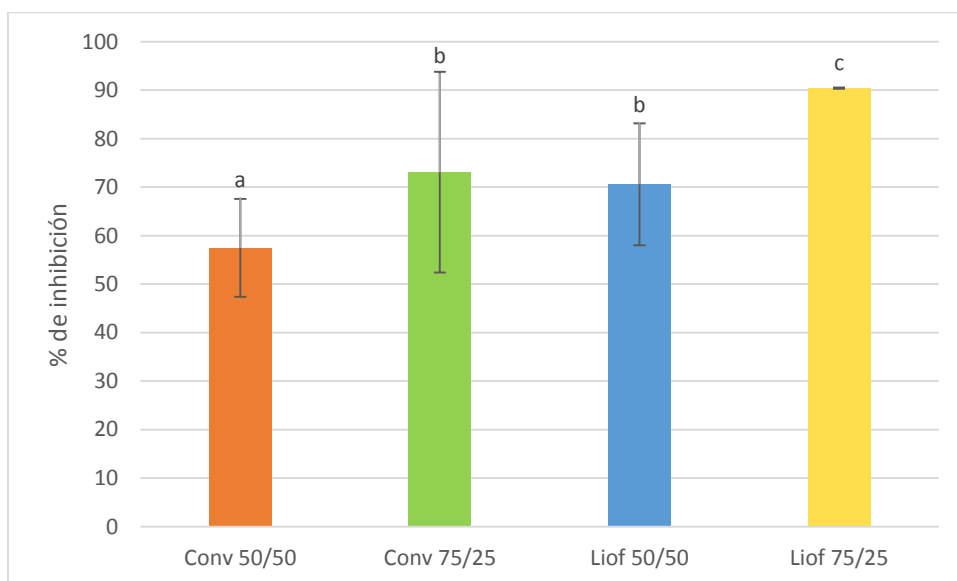
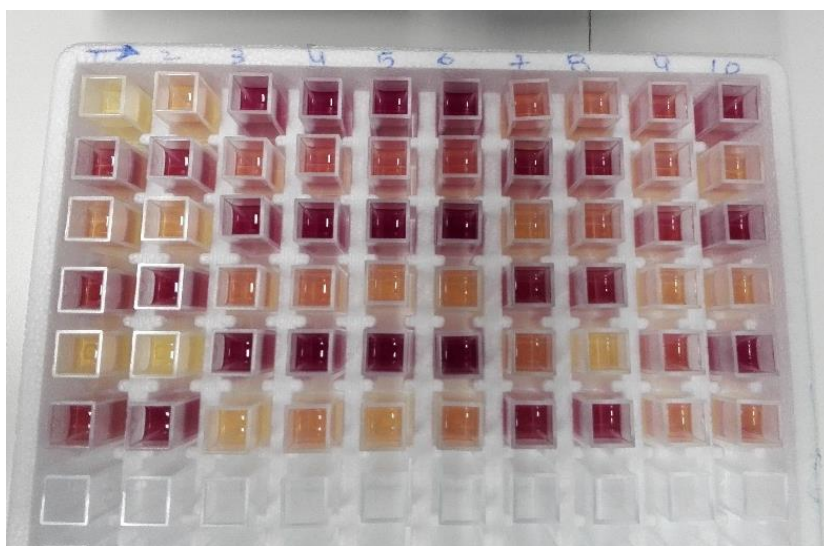


Figura 40. % de inhibición de las muestras Letras diferentes indican diferencia significativa entre las muestras para un nivel de significación del 95 %.

Tabla 12. % Inhibición por el método DPPH.

	<b>Conv 50:50</b>	<b>Conv 75:25</b>	<b>Liof 50:50</b>	<b>Liof 75:25</b>
<b>% Inhibición</b>	57,49 ± 10,08 <sup>a</sup>	73,07 ± 20,69 <sup>b</sup>	70,60 ± 12,58 <sup>b</sup>	90,41 ± 0,15 <sup>c</sup>
<b>CV total (%)</b>	18	28	18	<0,5

Diferente letra en misma fila indica diferencia significativa entre las muestras para un nivel de significación del 95 %.



*Figura 41. Cambio de color observado en el método DPPH tras los 40 min de incubación*

## 6. CONCLUSIONES

El presente estudio ha ayudado a caracterizar un proceso de obtención y análisis de extractos de hinojo marino (*C. maritimum*), con la finalidad de obtener un extracto con un alto contenido de polifenoles y una alta capacidad antioxidante. Podemos concluir que:

- Las extracciones con una mayor proporción de etanol: agua, ayudan a obtener una mayor cantidad de polifenoles.
- Conforme aumenta la temperatura del proceso, la cantidad de polifenoles se ve reducida notablemente.
- El secado por método convencional (aire caliente) es muy inestable, presentando mucha heterogeneidad en los resultados.
- El secado por liofilización y extracción con 75:25 de etanol: agua, fue el que mejores resultados presentó, en cuanto a cantidad de polifenoles, capacidad antioxidante, y el que más estabilidad mostró.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Acuña, F. (2006). *Química orgánica*, Costa Rica: Universidad estatal a distancia
- Atia, A., Barhoumi, Z., Mokded, R., Abdelly, C., & Smaoui, A. (2011). Environmental eco-physiology and economical potential of the halophyte *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(16), 3564–3571.
- Bobo-García, G., Davidov-Pardo, G., Arroqui, C., Vírseda, P., Marín-Arroyo, M. R., & Navarro, M. (2015). Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(1), 204–209. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6706>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Caleja, C., Barros, L., Antonio, A. L., Oliveira, M. B. P. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). A comparative study between natural and synthetic antioxidants: Evaluation of their performance after incorporation into biscuits. *Food Chemistry*, 216, 342–346. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.075>
- Casp A., Abril J. (2003). *Proceso de conservación de los alimentos*. España
- Chen, Q., Li, Z., Bi, J., Zhou, L., Yi, J., & Wu, X. (2017). Effect of hybrid drying methods on physicochemical, nutritional and antioxidant properties of dried black mulberry. *LWT - Food Science and Technology*, 80, 178–184. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.02.017>
- Cornara, L., D'Arrigo, C., Pioli, F., Borghesi, B., Bottino, C., Patrone, E., & Mariotti, M. G. (2009). Micromorphological investigation on the leaves of the rock samphire (*Crithmum maritimum* L.): Occurrence of hesperidin and diosmin crystals. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology*, 143(2), 283–292. <https://doi.org/10.1080/11263500902722527>
- García, E., Fernández, I., & Fuentes, A. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin- Ciocalteu, 2–8.
- Generalčić Mekinić, I., Blažević, I., Mudnić, I., Burčul, F., Grga, M., Skroza, D., ... Katalinić, V. (2016). Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.): phytochemical profile, antioxidative, cholinesterase inhibitory and vasodilatory activity. *Journal of Food Science and Technology*, 53(7), 3104–3112. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2283-z>
- Ibañez, F; Torre, P y Irigoyen, A. (2003). Aditivos alimentarios. *Universitas Navarrensis*, 1–10. Retrieved from [http://www.nutricion.org/publicaciones/revista\\_agosto\\_03/Funcionales/aditivos.pdf](http://www.nutricion.org/publicaciones/revista_agosto_03/Funcionales/aditivos.pdf)

- J. Tovar del Río. (2013). *Determinación De La Actividad Antioxidante Por Dpph Y Abts De 30 Plantas Recolectadas En La Ecoregion Cafetera Jennifer*. *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Jallali, I., Megdiche, W., M'Hamdi, B., Oueslati, S., Smaoui, A., Abdelly, C., & Ksouri, R. (2012). Changes in phenolic composition and antioxidant activities of the edible halophyte *Crithmum maritimum* L. with physiological stage and extraction method. *Acta Physiologiae Plantarum*, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-0943-9>
- Meot-Duros, L., Le Floch, G., & Magné, C. (2008). Radical scavenging, antioxidant and antimicrobial activities of halophytic species. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(2), 258–262. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.11.024>
- Muñoz Juárez, M. A., & Gutiérrez, D. M. (2004). Determinación de actividad antioxidante de diversas partes del árbol *Nicotiana Glauca*. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2), 1–4.
- Özen, B. T. (2010). Antioxidant activity of wild edible plants in the Black Sea Region of Turkey, 61(1), 86–94.
- Porras-Loaiza, A. P., & López-Malo, A. (2009). Importancia de los grupos fenólicos en los alime.
- Porras, A. ., & López-Malo, A. (2009). Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Tsia*, 121–134.
- Renna, M., Gonnella, M., Caretto, S., Mita, G., & Serio, F. (2017). Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.): from underutilized crop to new dried product for food use. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 64(1), 205–216. <https://doi.org/10.1007/s10722-016-0472-2>
- Tummanichanont, C., Phoungchandang, S., & Srzednicki, G. (2017a). Effects of pretreatment and drying methods on drying characteristics and quality attributes of *Andrographis paniculata*. *Journal of Food Processing and Preservation*, (December 2016), e13310. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13310>

## ANEXOS

**Tabla 11: Anova del parámetro L\***

Muestras	Subconjunto para alfa= 0.05	
	a	b
<b>Liof 50:50</b>	58,94 ± 9,08	
<b>Conv 50:50</b>	60,07 ± 2,61	
<b>Liof 75:25</b>		68,59 ± 6,49
<b>Conv 75:25</b>		68,60 ± 5,07

*Diferente letra en misma fila indica diferencia significativa entre las muestras para un nivel de significación del 95 %.*

**Tabla 12: Anova del parámetro a\***

Muestras	Subconjunto para alfa= 0.05	
	a	b
<b>Liof 50:50</b>	7,85 ± 3,99	
<b>Conv 50:50</b>	8,14 ± 1,01	
<b>Conv 75:25</b>	8,90 ± 2,43	
<b>Liof 75:25</b>		11,78 ± 4,27

*Diferente letra en misma fila indica diferencia significativa entre las muestras para un nivel de significación del 95 %.*

**Tabla 13: Anova del parámetro b\***

Muestras	Subconjunto para alfa= 0.05		
	a	b	c
<b>Liof 75:25</b>	26,59 ± 3,33		
<b>Conv 50:50</b>		31,52 ± 2,97	
<b>Liof 50:50</b>		32,87 ± 1,97	
<b>Conv 75:25</b>			36,32 ± 1,89

*Diferente letra en misma fila indica diferencia significativa entre las muestras para un nivel de significación del 95 %.*

**Tabla 14: Anova de la concentración de polifenoles**

Muestras	Subconjunto para alfa= 0.05		
	a	b	c
<b>Conv 50:50</b>	10,74 ± 0,53		
<b>Liof 50:50</b>	12,33 ± 0,72	12,33 ± 0,72	
<b>Conv 75:25</b>		14,09 ± 5,48	
<b>Liof 75:25</b>			17,61 ± 1,89

*Diferente letra en misma fila indica diferencia significativa entre las muestras para un nivel de significación del 95 %.*

**Tabla 15: Anova de la capacidad antioxidante**

Muestras	Subconjunto para alfa= 0.05		
	a	b	c
<b>Conv 50:50</b>	57,49 ± 10,08		
<b>Liof 50:50</b>		70,60 ± 12,58	
<b>Conv 75:25</b>		73,07 ± 20,69	
<b>Liof 75:25</b>			90,42 ± 0,15

*Diferente letra en misma fila indica diferencia significativa entre las muestras para un nivel de significación del 95 %.*