

Análisis químico de las especias: tomillo y salvia

Fernando Damián Reina¹, Luis Alberto Roche^{1, 2}, María Angélica Bianchi¹, Juan Miguel Languasco¹, Patricia Della Rocca¹

1 Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Buenos Aires, Departamento de Ingeniería Química, IDETQA, Investigación y Desarrollo en Tecnologías Químicas Aplicadas, Medrano 951 (C1179AAQ), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

2 CONICET La Plata y Universidad Nacional de La Plata, CIDCA, Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología, Calle 47 y 116, La Plata (B1900 AJJ), Buenos Aires, Argentina

patriciadellarocca@hotmail.com

Recibido el 16 de febrero de 2016; aceptado el 11 de marzo de 2016

Resumen

Las especias poseen componentes con importantes características antioxidantes, antimicrobianas y antifúngicas y presentan la particularidad de conferir aromas y sabores agradables que mejoran la calidad sensorial de los alimentos a los que se adicionan.

En el presente trabajo se analizaron los extractos de dos especias, tomillo y salvia, por espectrofotometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) para identificar grupos funcionales típicos de componentes que poseen capacidad antioxidante y se determinaron los compuestos fenólicos totales en cada una de ellas por el método de Folin-Ciocalteu.

PALABRAS CLAVE: COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES - ESPECTROFOTOMETRÍA INFRARROJA - FTIR - ANTIOXIDANTES - ESPECIAS

Abstract

Spices have important antioxidant, antimicrobial, antifungal characteristics and have the particularity to confer nice odor and taste in order to improve the food sensory quality.

In the present work, two spices, thymus and sage were analyzed by Fourier transform infrared spectrophotometry to identify typical functional groups of components that have antioxidant capacity and total phenolic compounds of each spices were determined by the Folin –Ciocalteu method.

KEYWORDS: TOTAL PHENOLIC COMPOUNDS - INFRARED SPECTROPHOTOMETRY - FTIR - ANTIOXIDANTS - SPICES

Introducción

Las especias generalmente se utilizan en la gastronomía para resaltar y mejorar la calidad sensorial de los alimentos. La condimentación proporciona un sabor agradable que favorece la reducción de la ingesta diaria de sodio y grasa. Sin embargo, también se las emplea en medicina por poseer componentes que imparten múltiples efectos beneficiosos en la salud. Varios de estos atributos beneficiosos se han comprobado experimentalmente a partir de estudios en animales y ensayos clínicos. Las propiedades antioxidantes e hipocolesterolémicas de las especias tienen efectos a largo plazo. Las propiedades antioxidantes son de particular interés para atenuar el estrés oxidativo que provoca el desarrollo de enfermedades degenerativas como las cardiovasculares, las neurodegenerativas, las enfermedades inflamatorias y el cáncer.

Muchos extractos de especias han demostrado un considerable efecto de estabilización de los lípidos ante las reacciones de oxidación y tienen un gran potencial comercial como fuente de nutraceuticos o ingredientes de alimentos funcionales (Shui y Leong, 2006). Antioxidantes con importante actividad han sido encontrados en la mayoría de las especias como el pimentón (Markus et al., 1999), el orégano y el jengibre (Kikuzaki y Nakatani, 1989) así como también el romero (Hall y Cuppett, 1998). La protección antioxidante ha sido atribuida a numerosos y variados compuestos que las integran, entre ellos: vitaminas C y E, tocoferoles, carotenos y compuestos fenólicos (Abushita et al., 1997).

La oxidación de los lípidos en los alimentos produce varios efectos perjudiciales en los alimentos como decoloración y desarrollo de aromas inaceptables. Asimismo, disminuye el valor nutricional del alimento y puede provocar riesgos en la salud debido a la formación de peróxidos

y aldehídos que pueden ocasionar daños en los tejidos vivos y también mutagénesis y carcinogénesis.

Tomillo

Características botánicas

El tomillo pertenece al género *Thymus* y a la familia de las Labiadas, es de clima templado y originario de los países de la cuenca mediterránea occidental. Crece sobre suelos secos y soleados y resiste bien las heladas y sequías. Presenta una gran diversificación en subespecies y la Península Ibérica es una de las zonas más ricas en cuanto al número. Se trata de una planta aromática (su nombre genérico proviene del griego *Thym*, en alusión a su intenso y agradable aroma) de 10-40 cm de altura y muy ramificada. Las hojas, de 3-8 mm, son lineales, oblongas, sentadas o brevemente pediceladas, opuestas, sin cilios, con el pecíolo o sus márgenes revueltos hacia abajo y blanquecinas por su envés. Las flores son axilares y están agrupadas en la extremidad de las ramas, formando una especie de capítulo terminal, a veces con inflorescencia interrumpida. Las brácteas son verde-grisáceas, el cáliz, algo giboso, con pelos duros, con tres dientes en el labio superior, cortos, casi iguales y dos en el inferior, muy agudos, más largos, con pelos en sus bordes y de color rojizo. La corola, un poco más larga que el cáliz, con el labio superior erguido y el inferior trilobulado y de color blanquecino o rosado. Los 4 estambres sobresalen de la corola y el fruto es un tetraqueno, lampiño, de color marrón. (Tránsito López Luengo, 2006).

Composición química

En su composición química destacan el aceite esencial y los flavonoides. El aceite esencial está constituido principalmente por fenoles monoterpénicos, como timol, carvacrol, p-cimeno,

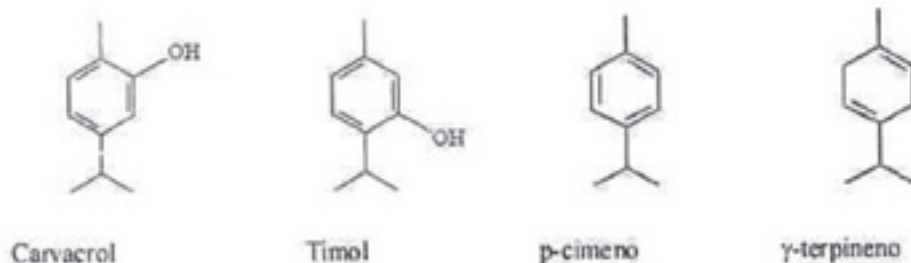


Fig. 1. Fenoles Monoterpénicos

γ -terpineno, limoneno, borneol y linalol (Figura 1). No obstante, se ha de tener en cuenta que la composición del aceite esencial es muy variable según la época y el lugar de cosecha.

Los terpenos son metabolitos secundarios de las plantas y son una clase de lípidos poco solubles en agua pero solubles en etanol y en cloroformo. Se conocen más de 40000 terpenos extraídos de las plantas aromáticas. Pueden poseer grupos funcionales alcoholes, cetonas o aldehídos. Los terpenos oxigenados se denominan terpenoides. Contienen átomos de carbono en múltiplo de 5, lo que parece indicar que hay un compuesto de cinco átomos de carbono en la construcción de su estructura. Es así como en un principio se pensó que eran derivados del isopreno o 2-metil-1,3-butadieno, compuesto de cinco átomos de carbono y que las unidades de isopreno estaban agrupadas cabeza con cola para formar los terpenos, y a esto se llamó regla del isopreno. Investigaciones posteriores permitieron comprobar que el compuesto de cinco átomos de carbono con el que se biosintetizan los terpenos es el pirofosfato de 3-metil-3-butenilo o pirofosfato de isopentilo y que era la materia prima para la obtención de los terpenos.

De esta forma, los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno (C5) que contienen: los terpenos de 10 C contienen dos unidades C5 y se llaman monoterpenos; los de 15 C tienen tres unidades de isopreno y se denominan sesquiterpenos, y los de 20 C tienen cuatro unidades C5 y son los diterpenos. Los triterpenos tienen 30 C, los tetraterpenos tienen 40 C y se habla de politerpenos cuando contienen más de 8 unidades de isopreno.

Flavonoides

Comprenden un gran grupo de metabolitos secundarios que derivan de subunidades que provienen de las rutas metabólicas del acetato y del shikimato. Se encuentran casi exclusivamente en plantas superiores, y se presentan de dos modos muy característicos: enlazados a unidades glucídicas (flavonoides glucósidos), o libres (flavonoides agliconas).

Los flavonoides (Figura 2) mayoritarios en el tomillo son luteolina, apigenina, naringenina, eriodictol, cirsilineol, salvigenina, cirsimarina, timonina y timusina, entre otros. Otros

componentes también destacables son los ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico (ácidos cafeico y rosmarínico), triterpenos (ácidos ursólico y oleanólico), saponinas, taninos y un principio amargo (serpilina).

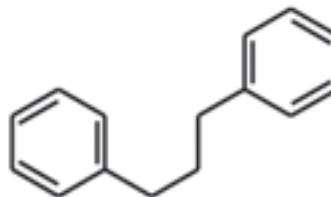


Fig. 2. Estructura básica de los flavonoides

Actividad antioxidante: Tiene acción antirradicalaria, en la que se consideran implicados el timol y el carvacrol del aceite esencial, así como los flavonoides y otros polifenoles.

Aplicaciones: El tomillo se utiliza habitualmente como condimento de uso culinario y en la elaboración de encurtidos. Favorece la conservación de los alimentos que se aliñan con él gracias a las propiedades antimicrobianas y a las antioxidantes en las que intervendrían el timol, el carvacrol, los flavonoides y los polifenoles.

Los polifenoles son un grupo de sustancias químicas encontradas en plantas caracterizadas por la presencia de más de un grupo fenol por molécula. Los polifenoles son generalmente subdivididos en taninos hidrolizables, que son ésteres de ácido gálico de glucosa y otros azúcares; y fenilpropanoides, como la lignina, flavonoides y taninos condensados.

Salvia

Todas las salvias presentan una composición química compleja con abundantes metabolitos de naturaleza terpénica: monoterpenos y sesquiterpenos constitutivos de sus aceites esenciales, diterpenos (carnosol, rosmanol, epirosmanol, ácido carnósico) y triterpenos derivados del ursano y oleanano (Tabla I). Además poseen abundantes compuestos fenólicos: flavonoides con sustituyentes sobre el C-6 y ácidos fenólicos, principalmente ácido rosmarínico.

En este trabajo se empleó la especie *Salvia officinalis* L. Su principal nombre vulgar es sal-

%	<i>S. officinalis</i>	<i>S. lavandulifolia</i>	<i>S. sclorea</i>	<i>S. triloba</i>
α -tuyona	18-43			1-5
β -tuyona	3-8,5			
Alcanfor	4,5-24,5	11-36		
1-8-Cineol	5,5-13	11-25		60
Humufeno	0-12			
α -pineno	1-6,5	4-11		
Canfeno	1,5-7			
Limoneno	0,5-3	2-5		
Linalol	<1	0,5-9	10-20	
Acetato de Bornilo	<2,5			
Sabineno		0,1-3		
Borneol		1-8		
Acetato de Linalilo		<5	45-75	
Terpinen-4-ol		<2		
Germacreno			trazas	
Coriofileno			trazas	

Fuente: Bruneton, 2001

Tabla. 1. Componentes mayoritarios del aceite esencial

via aunque también tiene otros nombres menos frecuentemente usados como son Salvia fina, Hierba sagrada, Salvia común, Salvia de Castilla, Salvia de Granada, Salvia del Moncayo, Salvia fina, Salvia oficial y Salvia real. En cuanto a la morfología de la especie podemos decir que es una mata o arbustillo espeso, de 30-90 cm de altura, y hasta 150 cm, de tallo leñoso en la base, erecto, muy ramificado, hojas opuestas, lanceolado-elípticas, vellosas, las inferiores pecioladas, las superiores sésiles. Las hojas son verde grisáceo por el haz y blanquecinas por el envés, rugosas, con muchas nervaduras, especialmente notables en el envés, con bordes finamente dentados. Sus flores son de color violeta o azul, a veces blancas o rosadas, bastante grandes, dispuestas en verticilos que constituyen espigas terminales de 3-6 flores; solo aparecen en los brotes de 2 años, su fruto está en tetraqueno, y su raíz es fusiforme, robusta y fibrosa. Es una planta aromática y melífera, muy escasa en estado silvestre. Su clima óptimo es templado y templado-cálido, sin variaciones bruscas de temperatura. Pleno sol, semi-sombra o sombra con exposición a mediodía. No tolera el exceso de agua. Le perjudican los inviernos muy rigurosos aunque es relativamente resistente a las heladas (tolera hasta 5° C). Además, es una planta termófila y xerófila que resiste bien a la sequía pero se puede prolongar el cultivo si aquella es prolongada.

La *Salvia officinalis* L. contiene: aceite esencial (0,8-2,5%), taninos condensados (3-7%, salviatanino), ácidos fenólicos (rosmarínico, cafeico, clorogénico, ferúlico, etc.), flavonoides (1-3%, luteolina, apigenina, genkwanina, hispidulina, cirsimaritina, 5,6,7-4'-tetrametoxiflavona [5-O-metilsalvigenina], nepetina, cirsililol y sus heterósidos), α -D-glucósidos de timol, mentol y tuyol, diterpenos (carnosol, ácido carnósico y rosmanol), triterpenos (α -amirina y β -amirina, betulina y ácidos ursólico y oleanólico y sus derivados hidroxilados), fitosteroles (β -sitosterol, estigmasterol) (Lu y Foo, 2000; Wang, et al., 2000; Miura, et al., 2001).

Los componentes mayoritarios del aceite esencial (Tabla 1), cuyo contenido mínimo no debe ser inferior al 1,5% (V/m), son por lo general cetonas monoterpénicas bicíclicas: α -tuyona, y en menor proporción, β -tuyona. Además contiene alcanfor, 1,8-cineol y borneol libre y esterificado. Sin embargo, la composición de este aceite esencial varía considerablemente según el órgano vegetal utilizado en la extracción y la estación del año en que se haya recolectado. Por ejemplo, en estudios realizados sobre distintos cultivos de *Salvia officinalis* L. se ha comprobado que entre diciembre y abril disminuye significativamente la concentración de monoterpénos oxigenados (α -tuyona y alcanfor) y aumenta el porcentaje de hidrocarburos

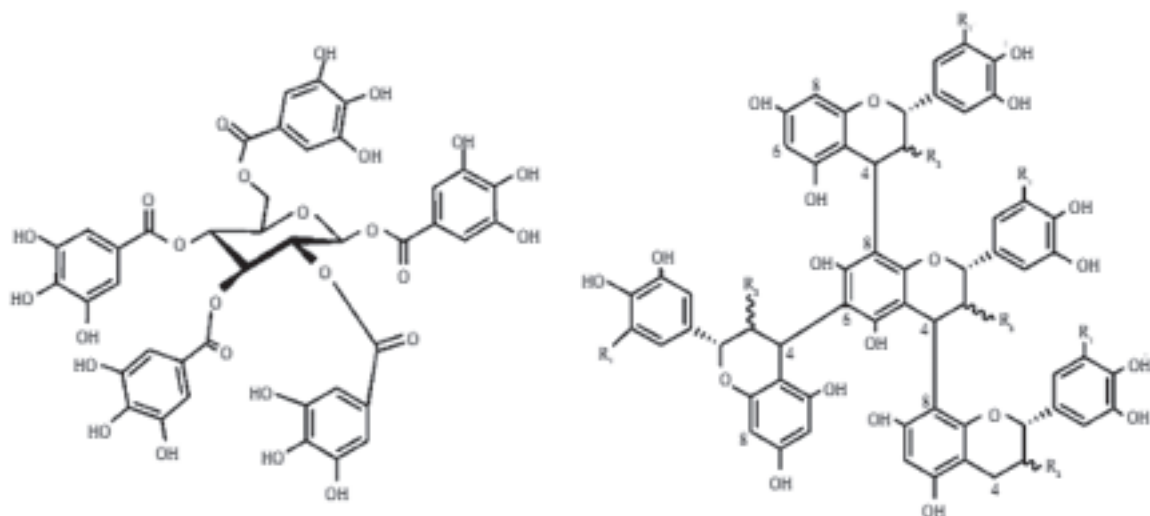


Fig. 3. Taninos: (A) tanino hidrolizable (B) tanino condensado

monoterpénicos (α -pineno y β -pineno y canfeno) (Santos y Fernández, 2001).

Materiales y métodos

Materiales: Se trabajó con las especias: salvia y tomillo.

Preparación de extractos:

Se prepararon extractos de salvia y tomillo en una concentración de 50% masa en masa, empleando etanol absoluto como solvente de extracción.

Se dejaron macerar a temperatura ambiente, al abrigo de la luz y con agitación ocasional, por espacio de 15 días. Posteriormente, se filtraron con lana de vidrio para eliminar el material en suspensión y se almacenaron en la heladera a 4° C hasta su análisis.

Espectrofotometría Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).

Se realizó la identificación de ciertos grupos funcionales característicos de algunos de los componentes de los extractos por espectrofotometría infrarroja IR por transformada de Fourier empleando un equipo marca Nicolet, modelo 520 P, por transmisión, extendiendo la muestra sobre un disco de seleniuro de cinc.

Determinación de polifenoles totales en los extractos.

Se llevó a cabo usando el método de Folin-Ciocalteu, basado en el Singleton y Rossi (1965) y modificado por procedimientos Waterhouse (2001). Se empleó un espectrofotómetro UV-visible, marca Shimadzu, serie UV 1700. Las determinaciones se realizaron por triplicado. Para realizar la cuantificación de los polifenoles totales se hizo una calibración por el método de estándar externo, utilizando ácido gálico monohidratado, reactivo analítico, ACS, como estándar de polifenoles. La curva de calibración se muestra en el ítem Resultados.

Resultados

Espectroscopía infrarroja de las especias

La espectroscopía infrarroja es una técnica analítica instrumental que permite conocer los principales grupos funcionales de la estructura molecular de un compuesto. Esta información se obtiene a partir del espectro de absorción de dicho compuesto al haberlo sometido a la radiación infrarroja en el espectrofotómetro.

Los enlaces vibran al absorber la energía adecuada dando lugar a un espectro IR característico. Según la fuerza de los enlaces y la masa de los átomos involucrados será necesaria más o menos energía para que se produzca la absorción de la radiación. Asimismo, la simetría de la molécula y su momento dipolar definen las absorciones, por lo que el espectro IR se convierte en una propiedad molecular específica del compuesto.

En las Figuras 4 y 5 se pueden apreciar los espectros infrarrojos de las especies tomillo y salvia, respectivamente. En la Figura 6 se colocaron juntos ambos espectros a efectos de su comparación visual.

El estiramiento O-H, característico de los polifenoles provoca la aparición de una banda en el rango $3700-3600\text{ cm}^{-1}$, si hay enlaces por puente de hidrógeno se produce un ensanchamiento de la banda y una ligera disminución en la frecuencia de absorción ($3600-3000\text{ cm}^{-1}$). Las vibraciones correspondientes al estiramiento C-H de los grupos metilo y metileno aparecen entre $3000-2850\text{ cm}^{-1}$. Las bandas correspondientes al grupo carbonilo C=O aparecen en el rango ($1830-1650\text{ cm}^{-1}$), posiblemente correspondientes a flavonoides y/o

cumarinas y el doble enlace C=C aromático, ocurren en pares a 1600 cm^{-1} y 1450 cm^{-1} .

La región de huella dactilar se halla en el rango ($1500-600\text{ cm}^{-1}$). En esta región del espectro pequeñas diferencias en la estructura y la constitución de una molécula dan por resultado cambios importantes en la distribución de los picos de absorción. Como consecuencia, la correspondencia de dos espectros en esta región constituye una prueba de su identidad. Muchos enlaces sencillos absorben en esta región y se produce una fuerte interacción entre enlaces vecinos. Dada la complejidad y singularidad del espectro en esta región es muy difícil su interpretación. Los espectros de las especies salvia y tomillo son similares en esta zona del espectro, excepto que el de tomillo

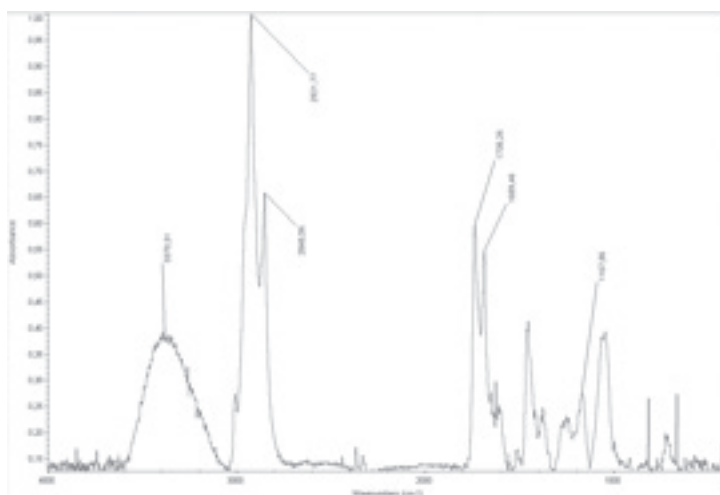


Fig. 4. Espectro infrarrojo (IR) obtenido para el extracto etanólico de tomillo (50:50 en peso)

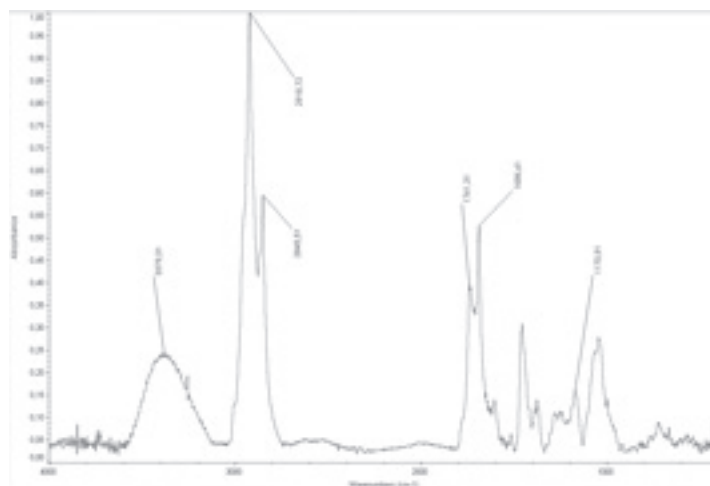


Fig. 5. Espectro infrarrojo (IR) obtenido para el extracto etanólico de salvia (50:50 en peso)

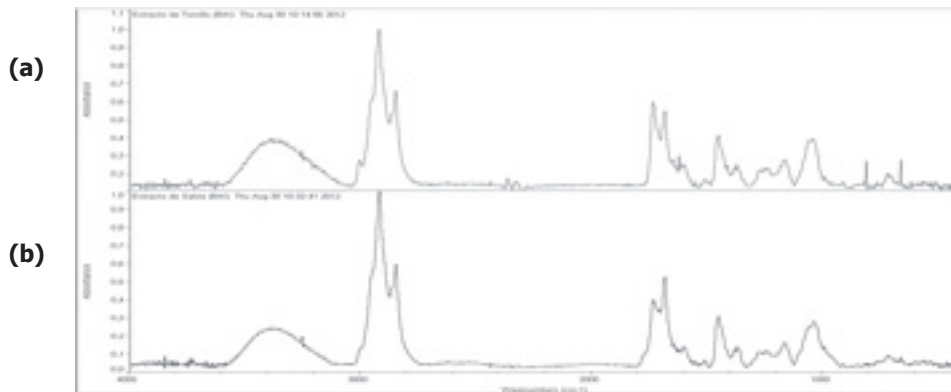


Fig. 6. Comparación de los espectros IR de los extractos de tomillo (a) y salvia (b).

presenta bandas en 828 cm^{-1} y 657 cm^{-1} . Los metilenos CH_2 , tienen una absorción característica de $1450\text{-}1485\text{ cm}^{-1}$ atribuible a una vibración de flexión.

Contenido total de polifenoles en los extractos de las especias

La Figura 7 muestra los datos experimentales de absorbancia a 755 nm obtenidos para las distintas concentraciones de ácido gálico expresadas como ppm.

La ecuación correspondiente a la recta de

calibración y el coeficiente de correlación obtenido es:

$$\text{Absc} = 0,00519 \text{ Conc.} + 0,01722$$

$$R^2 = 0,99802$$

La línea punteada en el gráfico delimita el error de la curva de calibración con un intervalo de confianza del 95 %.

Contenido de polifenoles totales

Extracto etanólico de tomillo: $854,3\text{ ppm}$

Extracto etanólico de salvia: $348,9\text{ ppm}$

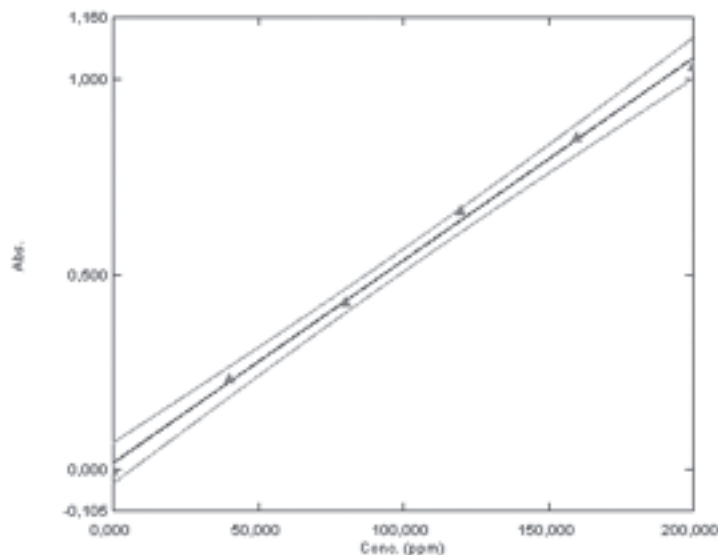


Fig. 7. Curva de calibración: Absorbancia versus Concentración

Conclusiones

Debido a que las especias poseen componentes muy diversos en su constitución resulta complicada la identificación de sustancias de manera particular mediante el análisis por espectrofotometría infrarroja por transformada de Fourier. Sin embargo, el reconocimiento de ciertas bandas propias de grupos funcionales pertenecientes a determinados componentes es posible.

Los extractos de salvia y tomillo presentan un perfil espectral infrarrojo muy parecido, donde se observan bandas ensanchadas a 3400 cm^{-1} que son indicativas de grupos -OH debido a la presencia de compuestos de naturaleza polifenólica, tal como podemos comprobar al medir su concentración en los extractos por espectrofotometría UV-visible. La mayor absorbancia (pico más alto) en este número de onda para el espectro IR del tomillo se corresponde con una

superior cuantificación de compuestos fenólicos totales (mayor concentración en los extractos). Se observan además bandas a 2920 cm^{-1} , correspondientes a vibraciones de estiramiento C-H.

Asimismo presentan una banda a 1740 cm^{-1} que indican la presencia de C=O y bandas a $1160\text{-}1170\text{ cm}^{-1}$ que confirman la presencia de uniones C-O, ambas pertenecientes al grupo funcional éster proveniente de taninos hidrolizables.

El contenido de compuestos fenólicos totales es mayor en el extracto etanólico de tomillo, casi 2,5 veces superior que en el de salvia.

Agradecimientos

Se agradece la colaboración de la Ing. Graciela De Zeta y los becarios: Nahuel Gauna Somá y Cynthia Tartagliani.

Referencias

- ABUSHITA, A., HEBISHI, E., BIACS, P., (1997). *Food Chem.*, 60, 207-212.
- BRUNETON J. (2001). *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales*. Zaragoza. Acribia.
- HALL, C., CUPPETT, S., DUSSAULT, P., (1998). *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75, 1147-1154.
- KIKUZAKI, H. y NAKATAMI, N., (1993). *J. Food Sci.*, 58, 1407-1410.
- LU Y. , FOO L.Y. (2000). Flavonoid and phenolic glucosides from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry*; 55 (3):263-7.
- MARKUS, F., DAOOD, H., KAPITÁN, J. y BIACS, P., (1999). *J. Agric. Food Chem.*, 47, 100-107.
- MERCADO-MERCADO, G., DE LA ROSA CARRILLO, L., WALL MEDRANO, A., LÓPEZ DÍAZ, J.A. y ÁLVAREZ-PARRILLA, E., (2013). Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de especies típicas consumidas en México, *Nutrición Hospitalaria*, 28 (1)36-46.
- MIURA K. , KIKUZAKI H. , Y NAKATANI N. (2001). Apianane terpenoids from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry*; 58;1171-5.
- ORTEGA HERNÁNDEZ-AGERO, T. CARRETERO ACCAME, M.E. Y VILLAR DEL FRESNO, A. M. (2002). *Salvia*. *Fitoquímica, farmacología y terapéutica*. *Farmacia Profesional*. Vol 16. Nº 7. 60-63.
- PAREDES SALIDO, F. y FERNÁNDEZ, A.C., (2005). Polifenoles de aplicación en farmacia. *Offarm*. vol. 24, nº 8, septiembre.
- SHUI G., LEONG L., (2006). *Food Chem.*, 97, 277-284.
- SINGLETON y ROSSI, (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdicphosphotungstic acid reagent. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144-158.
- SRINIVASAN, K., (2016). Spices and Flavoring Crops: Uses and Health Effects, *Encyclopedia of Food and Health*, 98-105.
- TRÁNSITO LÓPEZ LUENGO, M., (2006). Tomillo Propiedades farmacológicas e indicaciones terapéuticas. *Ámbito farmacéutico*. *Offarm*, vol. 25 nº 1.
- WANG M. , KIKUZAKI H. , ZHU N. , SANG S. , NAKATANI N. Y HO C. T. (2000). Isolation and structural elucidation of two new glycosides from sage (*Salvia officinalis* L.) *J. Agric. Food Chem.* 48(2):235-8
- WATERHOUSE, A. L., (2001). Determination of Total Phenolics, in *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, I1.1.1-I1.1.8, Wrolstad, R.E., Wiley.