

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. VARIABILIDAD QUÍMICA EN LOS ACEITES ESENCIALES

El papel de los vegetales como fuente de materias primas, alimentos, principios activos de medicamentos, etc., se apoya indudablemente en la gran diversidad de compuestos químicos que los constituyen. Esta diversidad viene dada tanto por factores genéticos como ambientales y su conocimiento es imprescindible para un adecuado aprovechamiento y gestión de los recursos vegetales. En el campo de las plantas aromáticas y medicinales, tal como posteriormente detallaremos con mayor profundidad, muchos de sus metabolitos secundarios poseen importantes y bien conocidos efectos terapéuticos; sin embargo, otros aspectos de su actividad biológica como sus efectos alelopáticos, semioquímicos y biológicos en general, no son tan conocidos ni aplicados, constituyendo actualmente una prometedora fuente de productos alternativos útiles en la producción e industria agroalimentaria.

Dado que dicha actividad biológica tiene su origen en la presencia de determinados principios activos, es necesario entonces determinar en qué medida los taxones vegetales se corresponden con una determinada composición química y si ésta se halla vinculada a factores ambientales: climatológicos, edáficos, etc. Por otra parte, el conocimiento de la variabilidad química de origen genético dentro de una determinada especie nos permite seleccionar para su propagación aquellos individuos que poseen una composición química particularmente adecuada. Así, por ejemplo, para la obtención de aceites esenciales, puede citarse la selección de tomillos con una elevada proporción de compuestos fenólicos como timol y carvacrol, la de salvas exentas de β -tuyona (compuesto neurotóxico), mentas con elevados porcentajes de mentol y bajos en mentofurano, etc.

Estas diferencias de composición química no son habitualmente cualitativas sino cuantitativas, aunque muy notorias, independientemente de los cambios debidos a factores ambientales. Se trata de verdaderos taxones químicos intraespecíficos o quimiovariedades, hoy día denominados habitualmente quimiotipos, y que son el fundamento de la denominada quimiotaxonomía vegetal.

La presencia de un componente (compuesto marcador), ausente en otros individuos de la especie, puede emplearse a veces para definir un quimiotipo, aunque lo más habitual es considerar como característico un compuesto cuando alcanza una proporción determinada. También puede basarse la diferenciación entre quimiotipos en perfiles de composición que incluyen varios componentes o sus relaciones. En cualquiera de estos casos, la consideración de la existencia de quimiotipos se basa en los siguientes criterios:

- a) En primer lugar, las variaciones de composición observadas entre individuos no deben ser asignables a factores propios de la toma de muestra, de su preparación y de su análisis.
- b) Es conveniente disponer de un número de datos analíticos para distintos individuos de la especie, que a través de la correspondiente validación estadística permita una definición rigurosa y objetiva de los quimiotipos. Esta metodología se basa principalmente en la aplicación de métodos de análisis estadístico multivariante a los datos procedentes del análisis por cromatografía de gases acoplada a la espectroscopía de masas como

técnica de identificación. Los métodos más utilizados en el campo de la quimiotaxonomía son el análisis de componentes principales (PCA) y el análisis de conglomerados (CA), que permiten agrupar aquellos individuos con un determinado grado de proximidad en cuanto a la composición química de sus aceites esenciales u otros tipos de extractos (Soria *et al.*, 2008).

c) Por último, debe contemplarse la posibilidad de que las diferencias observadas sean causadas por factores edáficos, estacionales o climáticos, principalmente:

- **El efecto combinado de la intensidad de la luz, la duración de los periodos de iluminación y la temperatura.** La influencia conjunta de estos factores influyen decisivamente en la composición y calidad de ciertos aceites esenciales, como el de *Mentha piperita* L., porque determinan que la biosíntesis fundamental siga una vía u otra diferente. El proceso (1) de la Figura 1, en que la pulegona se transforma principalmente en mentona, y ésta, sucesiva y parcialmente, en mentol y acetato de mentilo, se ve favorecido por una alta intensidad de la luz, bajas temperaturas nocturnas y días largos y templados (en torno a 20° C). La riqueza de estos componentes aumenta la calidad de esta esencia. Por el contrario, una intensidad de luz baja, temperaturas nocturnas altas, días cortos y temperaturas diurnas muy variables, favorecen el proceso (2), formación de mentofurano, provocando la disminución de la calidad de la esencia (García *et al.*, 1987).

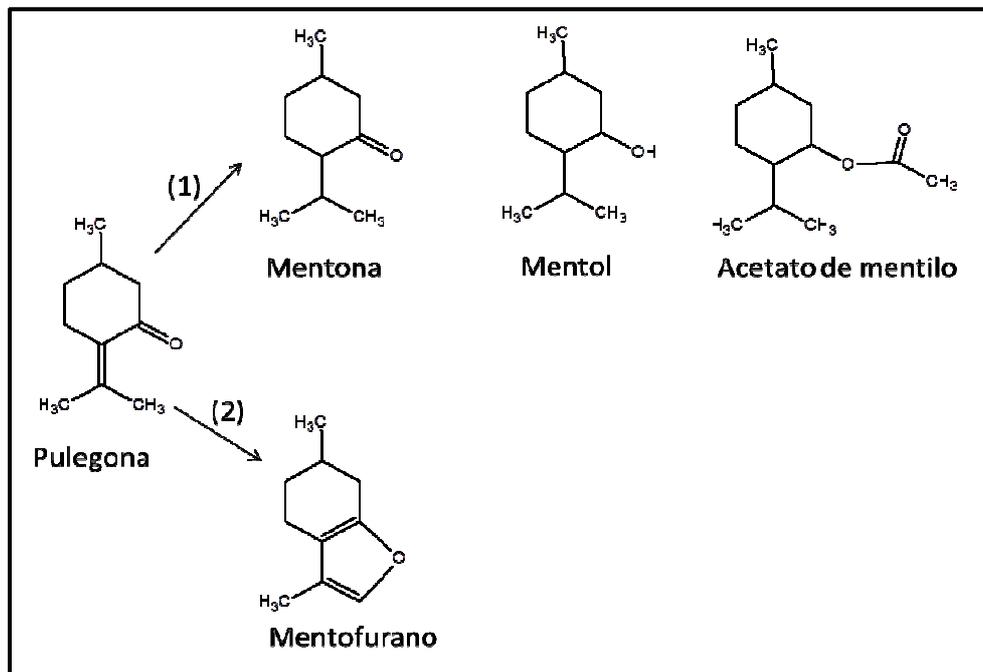


Figura 1. Biosíntesis fundamental de la pulegona

- **Las condiciones geobotánicas del medio:** clima, altitud, tipo de suelo, cantidad de lluvias, etc. En general, la concentración del aceite esencial en las plantas es más elevada durante el tiempo cálido siendo ésta la mejor época de recolección al menos en cuanto al rendimiento obtenido (Figueiredo *et al.*, 2008).

- **Edad de la planta y estado fenológico.** Dentro de los diversos factores que afectan a la composición de los aceites esenciales se encuentran los cambios fisiológicos relacionados con la edad de la planta y su estado fenológico (Figueiredo *et al.*, 2008). En muchas especies en las que la biosíntesis del aceite esencial y su acumulación tienen lugar, principalmente, en las hojas, la composición del aceite esencial varía con la edad de éstas; como ejemplo tenemos la *M. piperita*, donde las hojas apicales (las más jóvenes) dan un aceite formado principalmente por mentona; mientras que las hojas basales (las más viejas) están constituidas fundamentalmente por mentol y acetato de mentilo. Para una calidad satisfactoria de este aceite esencial se requieren concentraciones equilibradas de mentol, mentona y acetato de mentilo. El contenido de estos compuestos debe ser por lo menos 45% de mentol y 15-18% de mentona e isomentona, mientras que la cantidad indeseable de mentofurano debe ser inferior al 1,5% (Aflatuni, 2005). De este modo el material vegetal destilado debe estar formado por una mezcla equilibrada de hojas jóvenes y adultas y, a ser posible, con una cantidad mínima de flores.
- **Época de recolección y parte de la planta.** Los aceites esenciales se encuentran localizados en determinados órganos del vegetal: flores, tallos, hojas, frutos o raíces. En ocasiones las diferentes partes de la misma planta suministran esencias distintas en su composición como en el caso de los aceites extraídos de la raíz, el tallo u hojas del hinojo. Otro ejemplo significativo es la canela de Ceilán, que encierra en su corteza una esencia rica en el aldehído cinámico, mientras que en sus hojas y en las raíces predominan el eugenol y el alcanfor, respectivamente.
- Si se trata de planta cultivada, **el método de cultivo y el uso de fertilizantes, abono, pesticidas**, etc.

1.2. EL GÉNERO *MENTHA*

La familia de las Lamiaceae comprende unas 3.000 especies de plantas distribuidas por las regiones cálidas y templadas de todo el mundo. Son fundamentalmente hierbas y arbustos, muy aromáticos y ricos en principios activos, por lo que son muy valoradas en la medicina natural y en la farmacopea. Comprende unos 200 géneros y entre los más significativos se encuentra la *Mentha*. El género *Mentha* L. (subfam. Nepetoideae, tribu Mentheae), originario de las regiones templadas de Europa y Asia, se encuentra distribuido en los 5 continentes (Harley y Brighton, 1977; Gobert *et al.*, 2002). Su taxonomía es complicada dada la alta frecuencia de hibridación, la cantidad de especies poliploides y la gradual variación morfológica, tanto intra- como interespecífica; ello se agudiza aún más en los híbridos ya que algunas de las poblaciones presentan caracteres predominantes de uno u otro progenitor (Harley y Brighton, 1977; Mabberley, 1997). Hasta el momento se han publicado unos 900 binomios, de los que se reconocen alrededor de 25 especies y varios híbridos (Harley y Brighton, 1977; Mabberley, 1997).

Existen muchas discrepancias entre los botánicos y especialistas a la hora de asignar nombres a las mentas y por eso es frecuente encontrar una misma especie, variedad o híbrido con diferentes nombres científicos. A continuación se presenta una tabla resumen de las distintas especies del género *Mentha*, donde se especifica su nombre científico y su nombre común.

ESPECIES	SINÓNIMOS	NOMBRE COMÚN
<i>Mentha aquatica</i> L.		Menta acuática Menta blanca
<i>Mentha arvensis</i> L.		Menta negra Menta japonesa
<i>Mentha citrata</i> L.	<i>Mentha piperita</i> L. var. <i>Citrata</i>	Bergamota
<i>Mentha longifolia</i> L.		Menta silvestre Menta borde
<i>Mentha pulegium</i> L.		Poleo
<i>Mentha piperita</i> L.	<i>Mentha x pipetita</i> L.	Menta
<i>Mentha spicata</i> L.	<i>Mentha sativa</i> L <i>Mentha x verticillata</i> <i>Mentha viridis</i> L <i>Mentha nemorosa</i> Willd.	Hierbabuena Sándalo Menta verde Menta romana
<i>Mentha suaveolens</i> L.	<i>Mentha rotundifolia</i> L. <i>Mentha spicata</i> L. var. <i>rotundifolia</i>	Mastranzo Menta de burro

Tabla 1. Resumen de las distintas especies del género *Mentha*

1.3. DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS DE *MENTHA LONGIFOLIA* L.

1.3.1. Identificación taxonómica de la *Mentha longifolia* L. (Figura 2)

- **Reino:** Plantae.
- **División:** Magnoliophyta.
- **Clase:** Magnoliopsida.
- **Orden:** Labiales.
- **Familia:** Lamiaceae.
- **Género:** *Mentha*.
- **Especie:** *Mentha longifolia* L.
- **Nombre común:** Menta.



Figura 2. *Mentha longifolia* L.

Las subespecies reconocidas de *Mentha longifolia* L. ,según Lawrence (2006), son:

- Subsp. *longifolia*
- Subsp. *dumortieri* (Déséglise & Th. Durand) Briq.
- Subsp. *lavandulacea* (Willd) Briq.
- Subsp. *erminia* Briq.
- Subsp. *cyprica* (Heinr. Braun) Harley.
- Subsp. *grisella* Briq.
- Subsp. *diabolina* Briq.
- Subsp. *mollis* (Rochel) Briq.
- Subsp. *minutiflora* (Borbás) Briq.
- Subsp. *typhoides* (Briq.) Harley.
- Subsp. *caucasica* Briq.
- Subsp. *calliantha* (Stapf) Briq.
- Subsp. *noëna* (Boiss.) Briq.
- Subsp. *modesta* Briq.
- Subsp. *royleana* (Benth.) Briq.
- Subsp. *hymalaiensis* Briq.
- Subsp. *syriaca* (Déséglise) Briq.
- Subsp. *pellita* (Déséglise) Briq.
- Subsp. *schimperii* Briq.
- Subsp. *capensis* (Thunb.) Briq.
- Subsp. *polyadena* Briq.
- Subsp. *wissii* (Launert) Codd.

1.3.2. Descripción

La *M. longifolia* es llamada comúnmente menta de caballo, hortolana, menta silvestre o mentastro. La palabra *longifolia* significa de hojas largas, del latín *longi-*(*longus*) largo, y *-folium* que significa hoja.

Es una planta perenne, herbácea, con tallos erguidos de 25 – 120 cm, que presenta en ocasiones estolones acuáticos; tienen sección cuadrangular y una pilosidad grisácea o blanquecina. Las hojas, de 15 – 115 x 6 – 42 mm, son sésiles o cortamente pecioladas, de forma lanceolada, lisa o algo rugosa en la base, con el margen provisto de dientes irregulares y

patentes; la haz es gris tomentoso y el envés de color ceniciento por la presencia de una pilosidad afelpada gris o blanquecina.

Las flores, hermafroditas y pediceladas, se reúnen en inflorescencias bracteadas y ramificadas formadas por numerosos verticilastros que forman espigas densas y cilíndricas, unas 6 por tallo, de 4 – 10 x 1 – 1.5 cm. El cáliz, de hasta 3 mm, está formado por un tubo estrechamente campanulado, peloso, verde aunque a veces coloreado en la parte superior, que se abre al exterior por 5 dientes de hasta 1.2 mm, subiguales, ya que a veces los dos inferiores son algo más largos. La corola, de 3 – 3.5 mm, de color lila o blanco, está formada por un tubo que en el extremo tiene dos pequeños labios apenas marcados, el superior escotado y rosado, y el inferior con 3 pequeños lóbulos iguales. El androceo está formado por 4 estambres exertos, con anteras púrpuras de forma elipsoidal; el gineceo consta de un ovario súpero dividido en 4 del que surge un estilo con un estigma bífido. Florece de mayo a octubre. El fruto es una núcula de 0.54 – 0.79 mm, de elipsoide a subtrígona, de color pardo claro.

1.3.3. Hábitat y ecología

Crece en zonas húmedas, ya sean bordes de arroyos, junciales, prados húmedos, y en ocasiones en bordes de carretera y caminos donde hay más aportes de nitrógeno, desde los 440 a los 2300 m de altitud.



Figura 3. Hábitat característico de la *Mentha longifolia* L. (confluencia de los ríos Jiloca y Pancrudo, provincia de Teruel)

En cuanto a su comportamiento fitosociológico, es una planta característica de la Subalianza de *Mentho-Juncenion inflexi* (Alianza *Agropyro-Rumicion crispi*, orden *Moniletales coeruleae*, clase *Molinio-Arrhenatheretea*). Sus principales requerimientos ecológicos son:

- *Luz*: Penumbra.
- *Temperatura*: Calor moderado. Piso montano principalmente.
- *Continentalidad*: Intermedia.
- *Humedad*: Suelos húmedos o muy húmedos.
- *Acidez*: Suelos ricos en bases; pH 5,5-8.
- *Nitrógeno*: Principalmente suelos ricos, indicadora en riqueza de nutrientes.

1.3.4. Distribución

Aparece en toda Europa, y en la Península especialmente en la mitad norte. Su distribución en la Península Ibérica se muestra en la Figura 4:

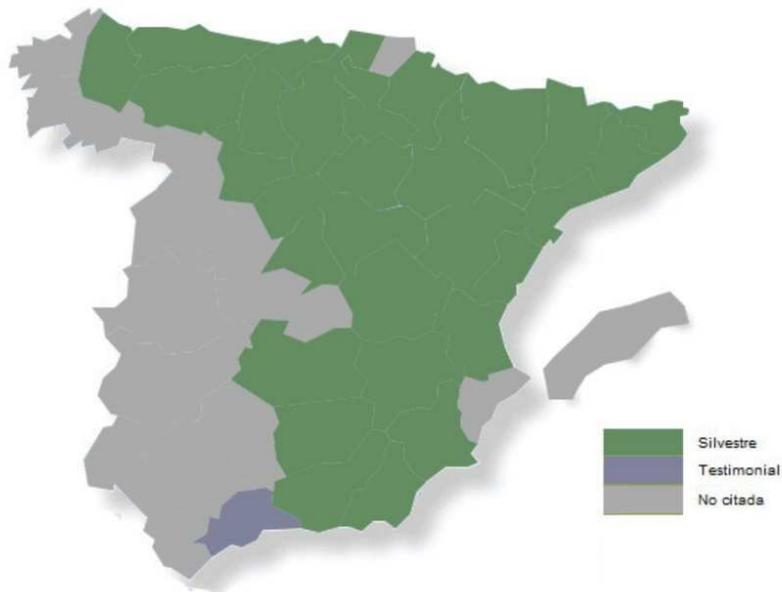


Figura 4. Mapa de distribución de *Mentha longifolia* L. según los datos obtenidos en Asturnatura.com

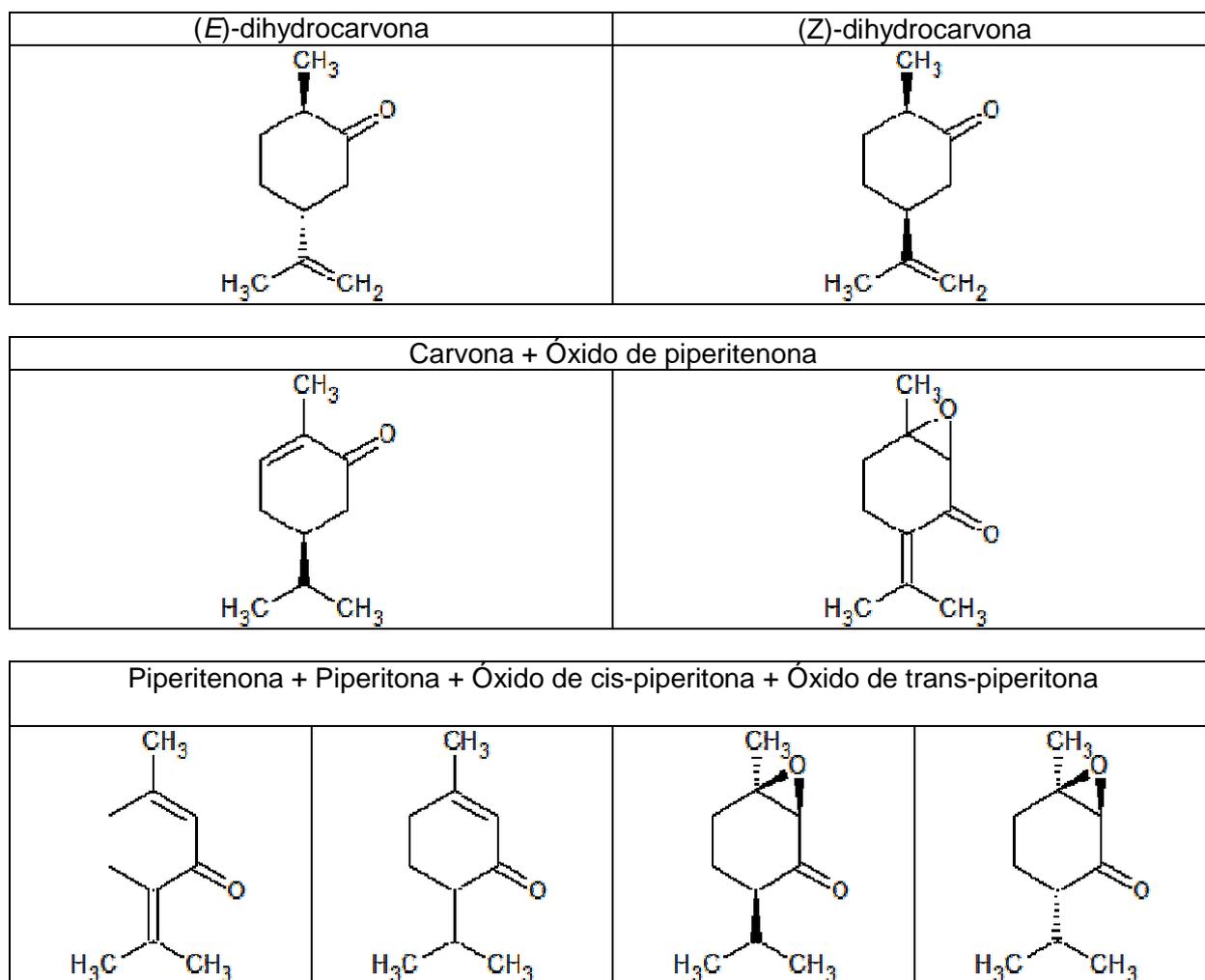
1.3.5. Aplicaciones y usos

Es una planta muy valorada, al igual que otras especies del género, por sus propiedades medicinales. Esta especie es útil por sus propiedades antisépticas y los beneficios que aporta en la digestión. Las hojas y tallos con flores son antiasmáticas, carminativas y estimulantes; la infusión elaborada con ellas es empleada para tratar fiebres, dolores de cabeza y problemas digestivos. En dosis altas es tóxica y no debe ser consumida por mujeres embarazadas ya que puede producir abortos.

También tiene propiedades nutricionales, las hojas, crudas o cocinadas, se emplean como aditivo a las comidas, especialmente para aromatizar ensaladas o cocidos. El aceite esencial de sus hojas se emplea para dar sabor a dulces.

1.3.6. Composición química

En las plantas del género *Mentha*, los metabolitos secundarios más importantes son los terpenoides (o isoprenoides) como por ejemplo: carvona, óxido de piperitona, pulegona, óxido de piperitenona, etc. Por lo general, el patrón predominante del aceite esencial consiste en monoterpenos acíclicos (ej. linalool), monoterpenos 2-oxigenados (ej. carvona) y monoterpenos 3-oxigenados (ej. mentol). Los principales quimiotipos de *Mentha longifolia* L. con sus compuestos característicos son, según Lawrence (2006):



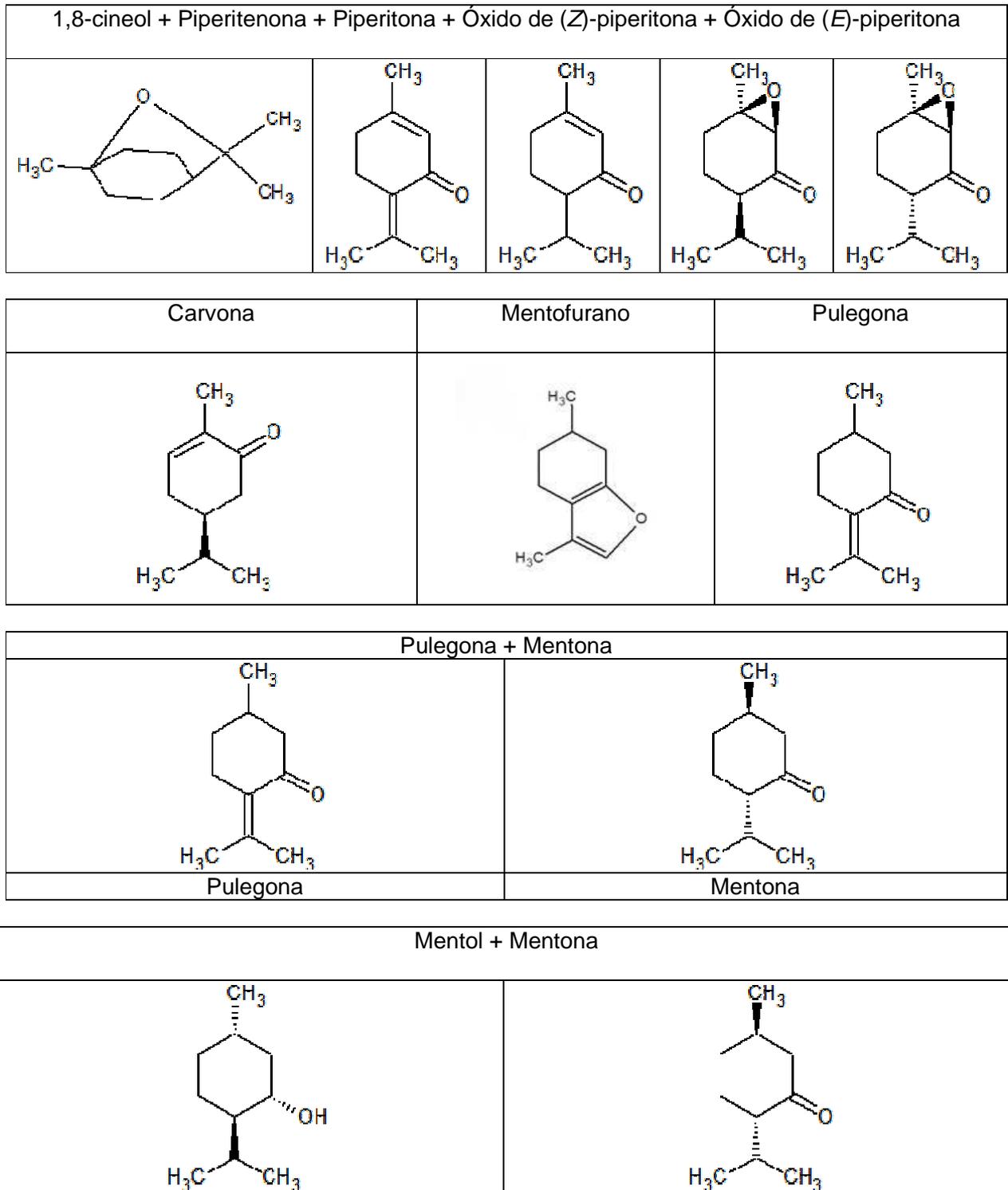


Figura 5. Principales quimiotipos de *Mentha longifolia* L.

En la siguiente tabla se presenta un análisis bibliográfico de la composición de la *Mentha longifolia* L, indicando el origen geográfico, los componentes mayoritarios y la referencia bibliográfica correspondiente.

ORIGEN GEOGRÁFICO	COMPONENTES MAYORITARIOS	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
Belgrado	<i>Trans</i> - y <i>cis</i> - dihydrocarvona (23.6% y 15.7%), piperitona (17.3%), 1,8-cineol (8.2%), neoisodihydrocarveol (7.8%), acetato de neoisodihydrocarveol (4.2%)	<i>Džamić et al., 2010</i>
Croacia	Carvona (33.48%), óxido de piperitenona (28.95%), Limoneno (10.29%), β -cariofileno (5.8%), Miriceno (3.21%), Borneol (2.74%)	<i>Mastelic y Jerkovic, 2002</i>
Egipto	1,8-cineol (28.8%), óxido de <i>cis</i> - piperitona (15.4%), piperitona (13.9%), piperitenona (13.8%), óxido de piperitenona (5.6%), borneol (3.3%)	<i>Fleisher y Fleisher, 1991</i>
Grecia	Carvona (58%), limoneno (11%), 1,8-cineol (9.2%), hidrato sabineno (2.1%), trans-dihydrocarvona (2.6%), <i>cis</i> -dihydrocarvona (5.4%), germacreno D (2.6%)	<i>S. Kokkini et al, 1996</i>
	Carvona (66.3%), limoneno (9.6%), 1,8-cineol (13.4%), Miriceno (1.6%)	
	Carvona (56.2%), limoneno (3.1%), 1,8-cineol (2%), trans-dihydrocarvona (32.9%)	
Israel	Pulegona (72.6%), 1,8-cineol (8.3%), mentona (4.85%), piperitona (3%)	<i>Fleisher y Fleisher, 1991</i>
India	Óxido de piperitenona (54.2%), óxido de <i>trans</i> - y <i>cis</i> - piperitona (24.1% y 7%), β -cariofileno (3%), <i>dl</i> -limoneno (1.4%), eucaliptol (1.2%)	<i>Pal Singh et al., 2008</i>
Irán	Piperitona (43.9%), limoneno (13.7%), <i>trans</i> -piperitol (12.9%)	<i>Rasouli y Rezaei, 2002</i>
Italia	Óxido de piperitenona (77.4%), germacreno D (3.7%), 1,8-cineol (1.6%)	<i>Maffei et al., 1988</i>
Pakistán	Óxido de piperitenona (40.1-64.6%), piperitenona (2-16.4%), borneol (4.4-13.3%), germacreno D (5.1-6%), β -cariofileno (2.5-4.2%), pulegona (2.1-3.9%)	<i>Hussain et al., 2010</i>
Polonia	Limoneno (5.8-15.3%), carvona (7.9-15.1%), (Z) y (E) <i>-b</i> -ocimeno (3.7-9.1%) y (3.8-8.5%), 1,8-cineol (5.4-8.2%), <i>b</i> -pineno (1.7-6.8%)	<i>Bertoli et al., 2011</i>

Sudáfrica	Mentofurano (55.3%), 1,8-cineol (7.2%), limoneno (7.2%), β -cariofileno (4.9%), β -pineno (2.1%)	<i>Viljoen et al., 2006</i>
	Mentofurano (59.7%), β -cariofileno (5.3%), 1,8-cineol (4.1%), limoneno (4.1%), germacreno D (3.8%)	
	Óxido de <i>cis</i> - piperitona (35.7%), óxido de piperitenona (14.6%), β -cariofileno (8%), 1,8-cineol (4.5%), limoneno (4.5%), germacreno D (4.5%)	
	Óxido de piperitenona (65.7%), óxido de <i>cis</i> - piperitona (14.7%), borneol (5.1%), β -cariofileno (2.5%), piperitenona (1.6%)	
	Mentofurano (61.6%), 1,8-cineol (6.3%), limoneno (6.3%), β -cariofileno (3.6%)	
	Mentofurano (51.4%), pulegona (12%), β -cariofileno (5.3%), mentona (5%), germacreno D (2.4%)	
	Mentofurano (58%), 1,8-cineol (8.9%), β -cariofileno (3.9%), limoneno (3.8%),	
	Mentofurano (52.8%), β -cariofileno (5.7%), 1,8-cineol (3.3%), limoneno (3.3%),	
	Pulegona (35%), mentona (31.1%), 1,8-cineol (13%), β -pineno (5.7%), borneol (3.3)	<i>Asekun et al., 2006</i>
Túnez	Mentol (32.5%), mentona (20.7%), pulegona (17.8%), 1,8-cineol (5.6%), terpineol-4 (4.9%), piperitona (2.2%)	<i>Hajlaoui et al., 2008</i>
	Pulegona (47.2%), 1,8-cineol (11.4%), mentona (10.7%), α -pineno (3.6%), d-cadineno (3.5%), α -terpineol (3.2%)	<i>Hajlaoui et al., 2009</i>
	Pulegona (54.41%), isomentona (12.02%), 1,8-cineol (7.41%), borneol (6.85%), óxido de piperitenona (3.19%), β -cariofileno (2.04%), α -humuleno (2.97%)	<i>Mkaddem et al., 2009</i>
Turquía	Óxido de <i>cis</i> - piperitona (18.4%), pulegona (15.5%), óxido de piperitenona (14.7%), mentona (7.9%), isomentona (6.6%), timol (6.6%)	<i>Gulluce et al., 2006</i>
Israel	Dos quimiotipos identificados: A (pulegona y mentona), B (óxidos de piperitona y piperitenona)	<i>Segev et al., 2012</i>
Irán	Piperitenona (35.8%), 1,8-Cineol (28.2%) y óxido de piperitenona (16.6%)	<i>Moradalizadeh et al. 2014</i>

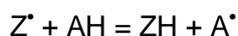
Tabla 2. Resumen de datos de composición química de *Mentha longifolia* L.

1.4. UN EJEMPLO DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA: LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN LOS ACEITES ESENCIALES

Existe un creciente interés en el uso de productos antioxidantes, particularmente en los destinados a impedir los presuntos efectos nocivos de los radicales libres en el cuerpo humano, y para prevenir el deterioro de grasas y otros constituyentes de los productos alimenticios. En ambos casos, hay una preferencia por los antioxidantes naturales y no de fuentes sintéticas (Abdalla y Roozen, 1999). Existe por lo tanto un creciente interés en el uso de métodos para la estimación de la eficiencia de sustancias tales como antioxidantes (Sánchez-Moreno, 2002; Schwarz, *et al.*, 2001).

Uno de los métodos que se utiliza actualmente se basa en el uso del radical libre estable 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (α , α -difeníl- β -picrilhidrazil; DPPH). Esta molécula es un ejemplo de radical libre estable como consecuencia de la deslocalización del electrón impar, lo que evita la dimerización de la molécula, tal como ocurre con la mayoría de radicales libres. La deslocalización también da lugar a el color violeta profundo, caracterizado por una absorción banda en solución de etanol centra en alrededor de 520 nm.

Cuando en una disolución de DPPH está presente una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno, entonces esto da lugar a la forma reducida (2) con la pérdida del color violeta característico. Representando el radical DPPH Z^{\bullet} (Figura 6) y la molécula donante AH, la reacción principal es:



donde ZH es la forma reducida (Figura 7) y A^{\bullet} son los radicales libres producidos en esta primera etapa. Este último radical, se somete a reacciones adicionales que controlan la estequiometría global, es decir, el número de moléculas de DPPH reducidas (decoloradas) por cada molécula del reductor.

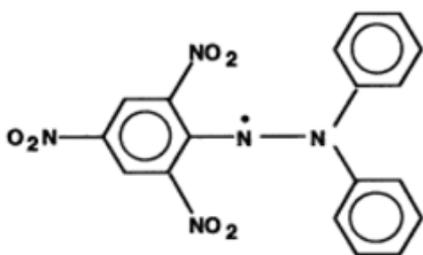


Figura 6. 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (radical)

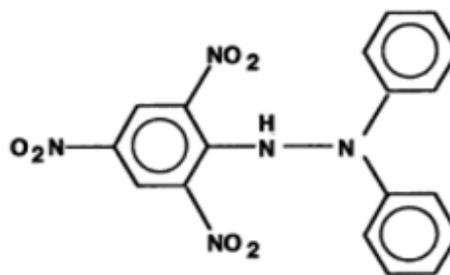


Figura 7. 1,1-difenil-2-picrilhidrazina (no radical)

De este modo se puede evaluar el carácter antioxidante de una sustancia por su capacidad para capturar los radicales Z^{\bullet} que se manifiesta en la decoloración de la disolución. Ésta puede cuantificarse espectrofotométricamente y compararse con la actividad de antioxidantes de referencia como el E-320 butil-hidroxi-anisol (BHA), el E-321 butil-hidroxi-tolueno (BHT) o el trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid).

Este método permite evaluar la actividad antioxidante de un aceite esencial como tal, sin proporcionarnos información acerca de qué componentes son los responsables de dicha actividad. La utilización de los métodos bioautográficos (Mimica-Dukic *et al.*, 2003; Cheng y Wu *et al.*, 2013) permite identificarlos. Básicamente, la técnica consiste en desarrollar la CCF utilizando las fases móviles y estacionarias adecuadas al tipo de extracto que se pretende estudiar y utilizar como agente revelador una disolución de DPPH. Las zonas decoloradas corresponden a las sustancias de mayor actividad antioxidante. Éstas pueden ser identificadas, tal como se ha llevado a cabo en este trabajo, mediante CCF preparativa. Para ello se separa la fase estacionaria (silica gel) de la zona cuyo Rf corresponde a aquella en que se ha observado la decoloración y un extracto de la misma se analiza mediante GC/MS.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En un anterior trabajo (Bonet, 2013) se estudió la quimiodiversidad de varias poblaciones de *Mentha longifolia* L. localizadas en la provincia de Teruel, mediante el análisis del aceite esencial obtenido de plantas individuales. Uno de los principales resultados de este trabajo fue evidenciar la coexistencia en una de las poblaciones de hasta cuatro quimiotipos claramente definidos, a los que ya se ha aludido en la introducción. Es importante destacar la limitada extensión de esta población, ya que abarcaba aproximadamente unos 500 m de las riberas de los ríos Jiloca y Pancrudo en su confluencia.

Esta elevada quimiodiversidad, en poblaciones tan reducidas, plantea a la vez problemas y oportunidades. Por una parte, con fines de investigación, el trabajo con muestras obtenidas a partir de la selección aleatoria de individuos y la mezcla de su material puede dar lugar a una falta de representatividad en dichas muestras. Ello es decisivo cuando se estudia la influencia de factores ambientales o relacionados con la metodología analítica en la composición de los aceites esenciales. Desde el punto de vista quimiotaxonómico, este método de muestreo también puede dar lugar a la propuesta de quimiotipos incorrectamente definidos si las muestras consideradas provienen a su vez de individuos pertenecientes a quimiotipos diferentes.

Por otra parte, esta elevada quimiodiversidad es también una oportunidad, sobre todo en el género *Mentha*, dónde la reproducción vegetativa tiene lugar con facilidad. Los estudios basados en muestras procedentes de individuos permiten una identificación más adecuada de los quimiotipos y por tanto la selección de individuos para su propagación susceptibles de proporcionar una determinada composición química de su aceite esencial. De este modo, la posibilidad de obtener cultivares correspondientes a quimiotipos seleccionados puede ser de notable interés por dos razones fundamentales:

- El logro de una especificidad mayor en la actividad biológica aplicada, ya que el aceite esencial de un determinado quimiotipo poseerá siempre una mayor proporción en sus componentes mayoritarios, potencialmente activos, que el procedente de una mezcla de quimiotipos diversos (el que se obtendría, por ejemplo, mediante la recolección de individuos al azar en la citada población). Al mismo tiempo, partir de una material vegetal químicamente homogéneo puede facilitar considerablemente la obtención de un producto final que se ajuste a los estándares de composición exigidos por la legislación.
- Desde el punto de vista de la investigación, la experimentación con cultivares químicamente homogéneos permite evaluar con rigor la influencia de los factores ambientales y agronómicos anteriormente citados, al poder controlar la variabilidad de origen genético.

Sin embargo, caracterizar la quimiodiversidad de una población a partir del análisis de individuos mediante la extracción del aceite esencial y su análisis por cromatografía de gases supone una tarea lenta y costosa, tanto por el tiempo como por el equipamiento requerido.

2.2. OBJETIVOS

Partiendo de la problemática descrita, los objetivos de este trabajo son:

1. Aplicar un método basado en la cromatografía en capa fina (CCF) para la identificación de los perfiles químicos de una muestra relativamente elevada de individuos procedentes de una población con una elevada variabilidad química (Bonet, 2013).
2. Evaluar dicho método mediante el análisis por cromatografía de gases y espectroscopía de masas (GC/MS) a los aceites esenciales obtenidos de cada uno de los grupos de individuos caracterizados por un determinado perfil cromatográfico en CCF. Dicha evaluación se basa en la correspondencia entre los quimiotipos definidos de este modo y los descritos en la bibliografía, así como los identificados mediante métodos estadísticos multivariantes en esta misma población, en estudios anteriores (Bonet, 2013).
3. Experimentar un método bioautográfico para la identificación de los compuestos a los que puede atribuirse la actividad antioxidante de un determinado aceite esencial. La aplicación de este método se complementa con la aplicación de la CCF preparativa y la identificación mediante GC/MS de los compuestos presentes en las zonas del cromatograma obtenido por CCF donde se observa una mayor actividad antioxidante.

2.3. PLAN DE TRABAJO

Para el logro de estos objetivos, se ha desarrollado el siguiente plan de trabajo:

- Obtención de muestras individuales (raíces) para su propagación vegetativa y posterior desarrollo en invernadero.
- Análisis por CCF de muestras individuales al llegar las plantas a la floración.
- Clasificación de los individuos a partir de los perfiles cromatográficos obtenidos mediante CCF.
- Recolección del material vegetal (hojas) en cada uno de los grupos de individuos establecidos.
- Obtención por hidrodestilación de los aceites esenciales de cada grupo (posible quimiotipo).
- Análisis por cromatografía de gases con espectroscopía de masas como método de detección para evaluar la identidad de los quimiotipos y comparación con los descritos en la bibliografía.
- Aplicación de un ensayo bioautográfico basado en la reacción del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) para la identificación de los compuestos de mayor capacidad antioxidante en uno de los quimiotipos identificados.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

3.1.1. Material vegetal

El material vegetal recolectado proviene de un enclave situado en la provincia de Teruel denominado Entrambasaguas, próximo a la ermita de la Virgen del Rosario, en la confluencia del río Jiloca y su afluente el Pancrudo. Las coordenadas geodésicas son: latitud: 40° 58' 05.87" N, longitud: 1° 18' 45.42" O y altitud: 854 m.



Figura 8. Mapa de localización de la población de *Mentha longifolia* L.

Desde el punto de vista climatológico, la depresión del Jiloca, en la que se localiza la población estudiada, se caracteriza por un clima mediterráneo continental (supramediterráneo, de acuerdo con los índices bioclimáticos (Rivas-Martínez, 2008; Cancio *et al.*, 2008)), con escasas precipitaciones concentradas principalmente en primavera. Los inviernos son largos con abundancia de heladas (en torno a 100 días anuales, desde septiembre llegando incluso a primeros de junio). La temperatura media anual es de 11,7 °C y la precipitación media anual es de 390 mm.



Figura 9. Imagen de *Menta longifolia* L. de la población Rosario

3.1.2. Método de obtención y preparación de las muestras

La recolección de las raíces se llevó a cabo en Enero de 2015. Se seleccionaron 50 muestras aleatoriamente sobre toda la superficie de la zona de la población (Figura 8). El siguiente paso fue la plantación en macetas usando sustrato "Compo Universal" de todos los individuos. El desarrollo de las plantas tuvo lugar en un invernadero de malla sombra, dentro del Campus de la UPV, para evitar principalmente el efecto de fuertes vientos o precipitaciones. La frecuencia de riego era de 3 o 4 días y se siguió el proceso desde comienzos del mes de enero hasta junio, donde se llevó a cabo la obtención de muestras para su análisis, mediante el corte de las partes aéreas de todos los individuos.

El proceso de desarrollo de las plantas, desde la siembra de las raíces hasta plena floración viene descrito en las Figuras 10, 11 a) y b), 12, 13, 14 a) y b), 15 y 16 a) y b).



Figura 10. Obtención del material vegetal: raíces con brotes



Figura 11. a) Imagen de las primeras brotaciones de *Menta longifolia* L.



Figura 11. b) Imagen de las primeras brotaciones de *Menta longifolia* L.



Figura 12. Imagen del cultivo de *Menta longifolia* L. en fase de desarrollo vegetativo



Figura 13. Imagen de *Menta longifolia* L. en proceso de riego



Figura 14. a) Imagen de las 50 muestras de *Menta longifolia* L. (fase intermedia)



Figura 14. b) Imagen de las 50 muestras de *Menta longifolia* L. (fase intermedia)



Figura 15. Imagen de las 50 muestras de *Menta longifolia* L. (fase final de desarrollo)



Figura 16. a) Imagen de *Menta longifolia* L. en estado de floración



Figura 16. b) Imagen de *Menta longifolia* L. en estado de floración

3.2. CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CCF DE LAS MUESTRAS INDIVIDUALES

3.2.1. Material y reactivos utilizados para la obtención de los extractos en CCF

- Material vegetal
- Vidrio de reloj
- Espátula
- Balanza
- Pipeta 2 ml
- Micropipeta
- Vaso de precipitados
- Embudo de sólidos
- Viales de 10 ml
- Tolueno para Análisis ACS,ISO (Panreac)
- Diclorometano (SCHARLAU, estabilizado con aproximadamente 500 ppm de amileno)

3.2.2. Método experimental

3.2.2.1. Obtención de los extractos

De cada una de las plantas se tomaron 5-10 hojas sanas de tamaño intermedio, uniformemente distribuidas en la planta. Después del secado al aire se trituraron con un mortero de laboratorio y se pesaron 0.2 g en un vial de 10 mL (Figura 18). Se añadieron 2 mL de diclorometano para análisis de residuos por cromatografía de gases, estabilizado con aproximadamente 500 ppm de amileno (SCHARLAU) y se agitaron durante 30 minutos en un agitador orbital Shaker S01 (Figura 17). El extracto filtrado de cada planta se introdujo en un nuevo vial, dejándose abiertos en vitrina de gases (Figura 21) hasta la completa evaporación del disolvente.

Al extracto seco de cada planta se añadieron 200 μ L de tolueno para Análisis ACS,ISO (Panreac) siguiendo la metodología propuesta por Wagner y Bladt (2001) para el análisis de aceites esenciales por CCF. Los nuevos extractos en tolueno se sellaron herméticamente con parafilm y fueron conservados a 4°C hasta el análisis.



Figura 17. Imagen del agitador orbital Shaker S01



Figura 18. Preparación de las muestras

3.2.3. Material y reactivos para CCF

- Cubeta cromatográfica
- Capilares (Blaubrand intraMark, 25 µl)
- Cromatofolios (DC-Fertigfolien Alugram Sil G/UV, Indicador fluorescencia de UV 254)
- Lámparas UV con cabina de visualización (Vilber Lourmat 254 y 365 nm)
- Pulverizador comercial
- Probeta de 100 mL y matraces aforados de 25 mL
- Cámara fotográfica (Canon SX60 HS)

3.2.3.1. Eluyentes

Se utilizó la mezcla 93:7 de los siguientes disolventes (Wagner y Bladt, 2001)

- Tolueno para Análisis ACS,ISO (Panreac)
- Acetato de etilo, Grado síntesis (Scharlau)

3.2.3.2. Reactivos

- Vainillina-ácido sulfúrico (Panreac): 1% de vainillina en etanol 96 % (disolución 1) y 10% de ácido sulfúrico en etanol (disolución 2). La placa se pulveriza con 10 ml de la solución 1, seguido inmediatamente por 10 ml de la solución 2. Después de calentar la placa a 110°C durante 5-10 minutos bajo observación, se evalúa la placa. Se puede detectar, por ejemplo, componentes de los aceites esenciales como terpenoides y fenilpropanoides.
- Anisaldehído-ácido sulfúrico: Se mezclan 0,5 ml de anisaldehído con 10 ml de ácido acético glacial, seguido de 85 ml de metanol y 5 ml de ácido sulfúrico concentrado, en ese orden. La placa de CCF se pulveriza con 10 ml aproximadamente, calentándola durante 5-10 minutos. Se evalúa la placa a simple vista o en UV-365 nm. El reactivo tiene una única estabilidad limitada y ya no se puede utilizar cuando el color se vuelve a rojo-violeta. Se utiliza para la detección de terpenoides, fenilpropanoides, principios amargos y saponinas.

3.2.4. Procedimiento experimental

Para el desarrollo de la CCF se utilizaron los cromatofolios indicados cortados en cuadrados de 10 cm x 10 cm y se utilizaron micropipetas de 25 µL para aplicar las manchas de extracto sobre la línea base del cromatofolio (Figura 19). En cada cromatofolio se aplicaron 6-7 muestras y ello se realizó por triplicado ya que se iban a utilizar tres reveladores distintos para la visualización de cromatograma.

Una vez evaporado el disolvente de los extractos, se colocan los cromatofolios en la cubeta a la que se ha añadido la cantidad necesaria de eluyente, dejándola tapada durante unos 15 minutos para que el interior de la cubeta quede saturado con sus vapores. Cuando el frente del disolvente se halla aproximadamente a 1 cm del extremo superior del cromatofolio, se extrae éste de la cubeta y se marca con lápiz el frente del disolvente, dejándolo evaporar completamente en la vitrina de gases.

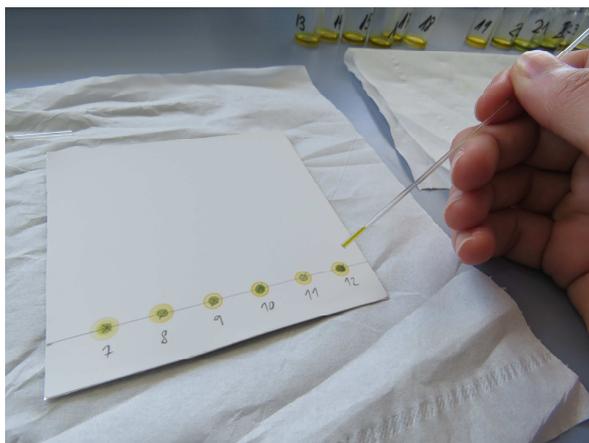


Figura 19. Aplicación de las muestras en cromatofolio



Figura 20. a) Cubeta

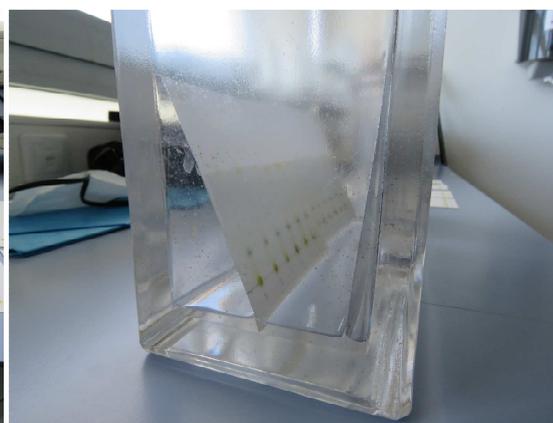


Figura 20. b) Cubeta



Figura 21. Vitrina de gases



Figura 22. Lámparas UV con cabinas de visualización (Vilber Lourmat 254 y 365 nm)

Posteriormente, para cada serie de muestras, analizadas por triplicado, se procede del modo indicado para cada reactivo, obteniendo cromatogramas como los siguientes, siendo fotografiados a continuación.

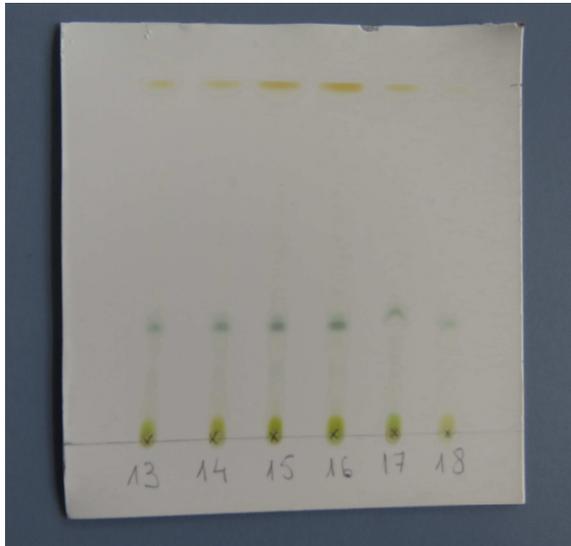


Figura 23. Cromatograma observado a la luz visible visible

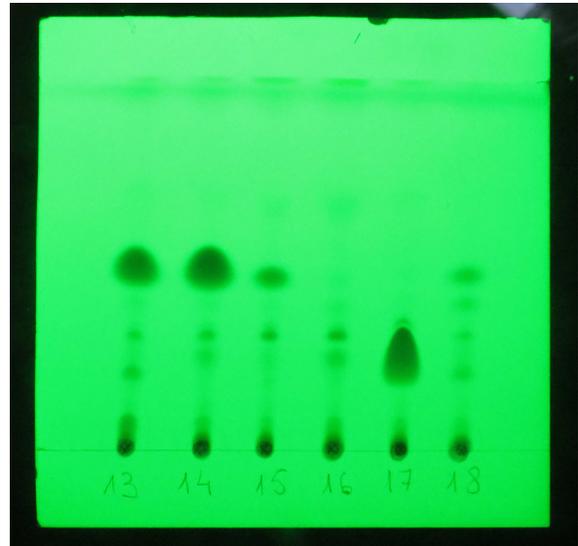


Figura 24. El mismo cromatograma observado bajo radiación ultravioleta a 254 nm



Figura 25. Aplicación del reactivo a los cromatofolios



Figura 26. Cromatograma obtenido después de pulverizar con vainillina en ácido sulfúrico y calentamiento posterior a 105 °C

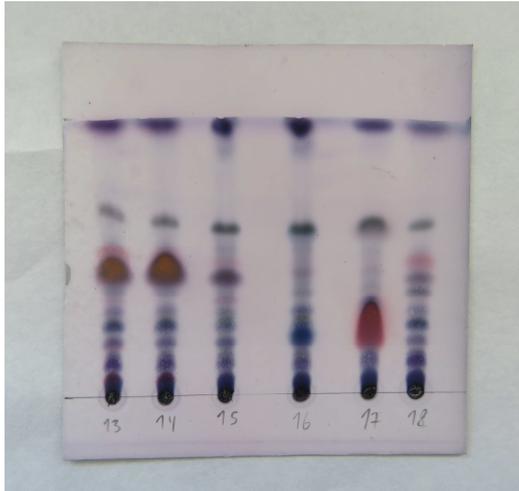


Figura 27. Cromatograma con anisaldehído y ácido sulfúrico

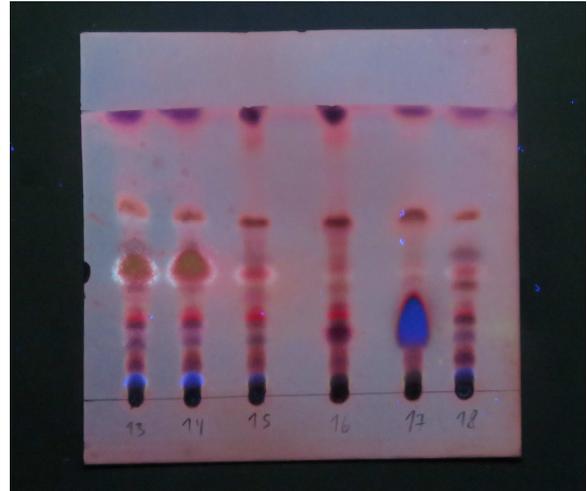


Figura 28. Cromatograma tratado con anisaldehído y ácido sulfúrico, visualizado bajo radiación ultravioleta a 365 nm

3.2.5. Clasificación de las plantas individuales según el perfil cromatográfico en CCF y obtención de las muestras para la extracción de los aceites esenciales para cada grupo de plantas (posibles quimiotipos)

Los perfiles cromatográficos obtenidos para los 50 individuos fueron agrupados por su similitud independientemente por dos personas, verificando posteriormente el grado de coincidencia. Ésta fue total ya que los cromatogramas presentaron, a través de los diferentes métodos de visualización, manchas que permitieron discriminar claramente los cinco grupos establecidos.

Las hojas correspondientes a los individuos pertenecientes al mismo grupo (perfil cromatográfico en CCF) se reunieron para obtener la muestra de material vegetal que posteriormente se sometió a hidrodestilación para la obtención del aceite esencial. Para la obtención de las muestras se desecharon las hojas amarillentas o dañadas, así como los tallos más lignificados y las inflorescencias. Posteriormente se almacenaron en bolsas de polietileno y se conservaron a -40°C hasta el momento del análisis.

3.3. OBTENCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES POR HIDRODESTILACIÓN

3.3.1. Fundamentos

La hidrodestilación es una técnica de destilación por arrastre con vapor de agua, en la cual el material vegetal se encuentra en contacto con el agua hirviendo. La separación de los componentes más volátiles, que son los que constituyen el aceite esencial, se basa en la aditividad de las presiones de vapor de líquidos inmiscibles, como lo son el agua y los compuestos que forman el aceite esencial. Dado que la ebullición tiene lugar cuando la presión de vapor es igual a la externa (en este caso la atmosférica), al calentar conjuntamente el agua y

el material vegetal, los componentes volátiles de éste pueden pasar a estado de vapor a una temperatura notablemente inferior (en torno a la temperatura de ebullición del agua) a la su temperatura de ebullición como sustancias puras. De esta manera, el vapor que se genera contiene pequeñas cantidades de aceite esencial que al condensarse, por su inmiscibilidad, quedan separadas de la fase acuosa (normalmente en la parte superior ya que suelen ser menos densos que el agua).

3.3.2. Reactivos y material de laboratorio

El desarrollo de la hidrodestilación fue llevado a cabo con los siguientes reactivos y material de laboratorio:

- Agua destilada, utilizada en las hidrodestilaciones con el equipo Clavenger
- Diclorometano (SCHARLAU, estabilizado con aproximadamente 500 ppm de amileno)
- Sulfato de sodio anhidro (Panreac, para análisis)
- Soporte con dos nueces y pinzas para el montaje del Clavenger
- 2 vasos de precipitados de 1 L
- Matraz-balón de 500 ml (esmerilado 29/32) con manta calefactora
- Matraz-corazón de 50 ml (esmerilado 14/23)
- Placa calefactora
- Horno microondas
- Mesa de altura regulable
- Termómetro
- Clips de sujeción para los matraces balón (dos para 14/23 y uno para 29/32)
- Matraz-balón rotavapor
- Embudo de vidrio
- Embudo de sólidos
- Pipetas Pasteur
- Papel de filtro
- Probeta 10 ml
- Balanza
- Matraz aforado 5 ml
- Viales 10 ml
- Espátula
- Bases de apoyo matraces-balón
- Parafilm

3.3.3. Equipos de Laboratorio

En este trabajo, se ha utilizado el equipo de hidrodestilación Clavenger, que permite desarrollar eficazmente el proceso explicado anteriormente. El equipo está compuesto por un matraz por el que se introduce la muestra vegetal y agua destilada, una manta calefactora, un tubo colector y un refrigerante a través del cual circula agua fría (Figura 29). Una vez que la manta calefactora calienta el agua del matraz y ésta entra en proceso de ebullición, el vapor de agua transporta el aceite esencial de la muestra (de naturaleza volátil y ambos se condensan en el refrigerante) hasta depositarlo en el cuerpo del destilador Clavenger. En ese momento, se produce una separación entre la fase acuosa (hidrolato) y la orgánica (aceite esencial) que puede obtenerse dejando fluir, mediante una llave, la fase inferior que normalmente es la acuosa. Se va reciclando en el matraz de destilación la fase acuosa, consiguiendo de esta forma que se reduzca la posibilidad de que pequeñas cantidades de componentes del aceite puedan quedar retenidas en el agua. Este proceso se ha de realizar, en principio, durante 2 horas, para asegurar que la extracción de todos los constituyentes volátiles de la planta resulte efectiva.

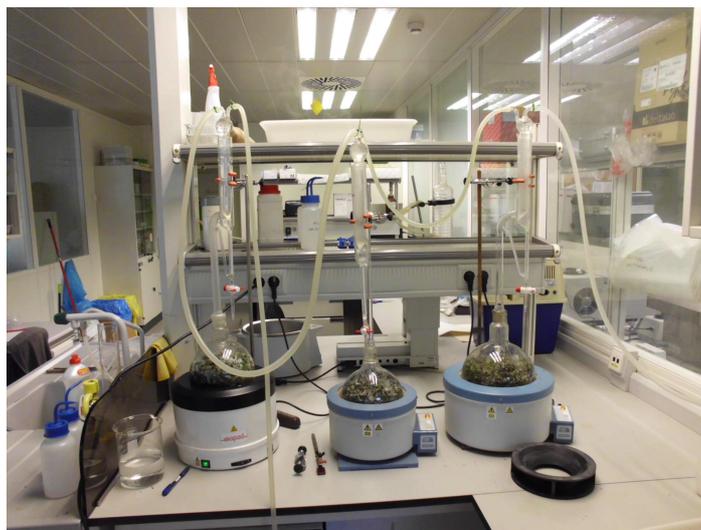


Figura 29. Fotografía del Equipo Clavenger para hidrodestilación (Vidrafoc)

3.3.4. Desarrollo de la hidrodestilación

Se sometieron a hidrodestilación las siguientes muestras, correspondientes al material vegetal de cada uno de los grupos de plantas establecidos. La masa de las muestras fue:

- Hojas A = 241,6 g
- Hojas B = 58,21 g
- Hojas C = 147,4 g
- Hojas D = 12,90 g
- Hojas E = 25,93 g

Una vez introducido cada uno de los diferentes grupos en un matraz distinto, se añade agua destilada en una proporción de 100 ml/10 g de material vegetal. Se une al Clavenger, poniéndolo en contacto con la manta calefactora hasta llegar al estado de ebullición y manteniendo la temperatura constante a lo largo del proceso. Cuando se observa en el Clavenger que no se aprecia ningún incremento del aceite esencial, la destilación finaliza, que en el caso del éste trabajo, fue de 2 h.

Una vez concluida la destilación, se procede a separar el aceite esencial para obtener una disolución del mismo en diclorometano (DCM). Sabiendo que el aceite esencial tiende a quedarse adherido en las paredes, es aconsejable arrastrarlo con una cantidad conocida de DCM, que posteriormente formará parte de la disolución de aceite esencial. De esta manera, lo que se recoge en el tubo de ensayo es una mezcla heterogénea de hidrolato y disolución de aceite esencial en DCM. Se deja reposar unos diez minutos, hasta que la fase orgánica (aceite esencial disuelto en DCM) queda en el fondo y en la parte superior la fase acuosa (el DCM es más denso que el agua). Una vez recogido el aceite esencial, la fase acuosa se elimina succionándola con una pipeta Pasteur y la fase orgánica se deshidrata añadiendo sulfato de sodio anhidro. Por último, con otra pipeta Pasteur, se extrae la disolución de aceite esencial en DCM y se lleva a un vial cromatográfico, completando el volumen con DCM hasta 1,5 ml, que es la capacidad del vial. Se etiqueta el vial y se sella con teflón y parafilm, guardándose a -18 °C en el congelador.

3.4. MATERIAL Y MÉTODOS EN LAS TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS EN FASE GASEOSA

En las determinaciones analíticas realizadas en este trabajo, se ha empleado el detector de espectroscopia de masas (CG-EM) para la identificación inicial de los componentes de las muestras de aceite esencial.

3.4.1. Equipos y métodos de trabajo para la cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG/EM)

El equipo empleado consta de un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masas Clarus 500 GC-MS (Perkin-Elmer Inc. Wellesley, EEUU) equipado con una columna capilar ZB-5 (5% fenil – 95% dimetilpolisiloxano) (30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μ m; Phenomenex Inc., Torrance, EEUU). La fase móvil es el gas Helio con un caudal de 1,2 mL/min. La temperatura del inyector es de 250°C, mientras que la temperatura del horno se programó desde 50°C a 250°C a razón de 3°C/min. La detección se realizó en modo de ionización de impacto electrónico (*EI mode*, 70 eV), siendo la temperatura de la fuente de ionización 200°C. Los espectros se obtuvieron mediante el modo de escaneo total de iones (rango de masas m/z 45-500 uma). Los cromatogramas y espectros se procesaron con el *software* Turbomass 5.4 (Perkin-Elmer Inc.). Los datos obtenidos son registrados y comparados con los de la base de datos NIST MS Search 2.0 (Thermo Electron Corp., Waltham, EEUU), de forma que las sustancias correspondientes a cada pico del cromatograma son identificadas según las coincidencias de alta probabilidad con los espectros de masas dados por la base de datos.



Figura 30. Fotografía de cromatógrafo de gases y un detector de masas Clarus 500 GC-MS

3.4.2. Análisis e interpretación de los datos procedentes de los análisis por cromatografía de gases. Identificación de los componentes mayoritarios del aceite esencial de *Mentha longifolia* L.

En el análisis llevado a cabo en este trabajo, la identificación ha sido realizada combinando el cálculo de los índices de retención de Kovats y el análisis mediante CG-EM.

Para realizar el cálculo del índice de Kovats de cada pico, es necesario determinar, en las mismas condiciones de trabajo, los tiempos de retención de la serie homóloga de los *n*-alcanos considerados, obteniendo el cromatograma correspondiente:

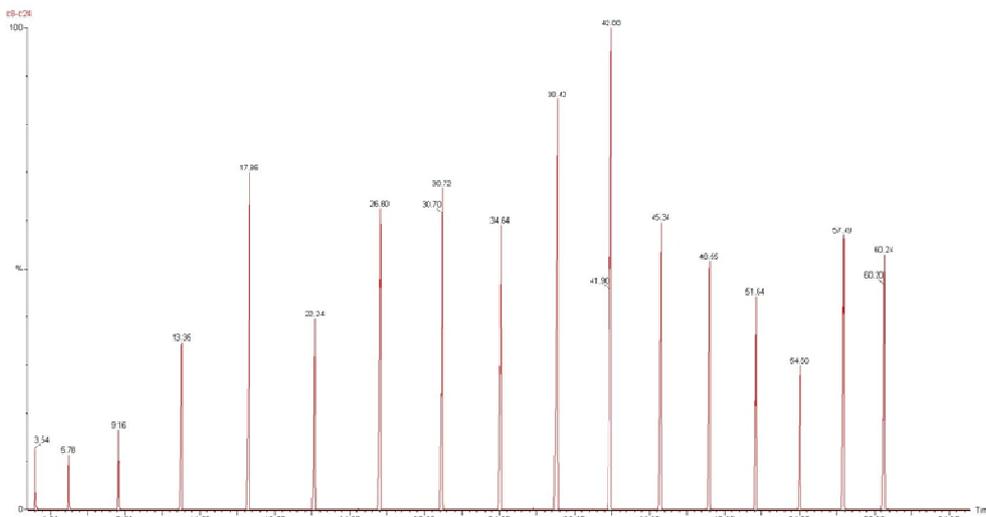


Figura 31. Cromatograma de los patrones de la serie homóloga de los *n*-alcanos considerados

A partir de aquí, mediante una sencilla hoja de cálculo, podemos aplicar la fórmula del índice de Kovats:

$$IK = \frac{100 \times n \times 100 \times (\log_{10} t - \log_{10} x)}{(\log_{10} y - \log_{10} x)}$$

En cuanto a la aplicación de la espectrometría de masas para la identificación de los componentes del aceite esencial estudiado, se ha aplicado el programa AMDIS (D'Arcy y Mallard, 2004) que permite analizar el espectro de masas de cada pico del ión-cromatograma y compararlo con los de la librería NIST 2.0; de este modo se obtiene un informe en el que se proporciona un número predeterminado de sustancias ordenadas según la mayor similitud de sus espectros de masas con el del pico estudiado. Dada la múltiple procedencia de los datos que constituyen dicha librería, es habitual que varias de las posiciones iniciales en la lista proporcionada correspondan a la misma sustancia, lo que habitualmente significa que dicha sustancia corresponde muy probablemente al pico estudiado.

El siguiente ejemplo muestra el proceso de identificación mediante CG-EM

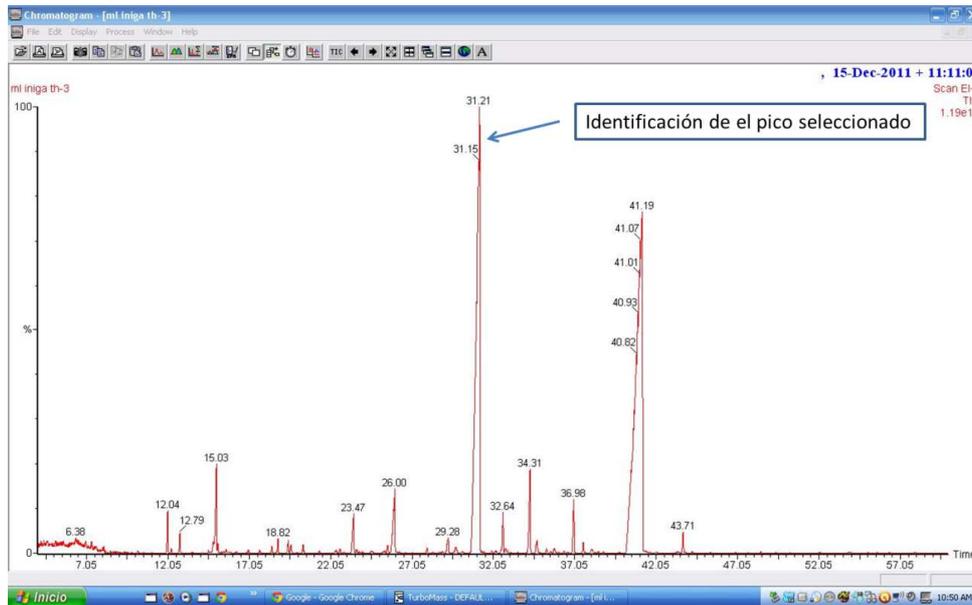


Figura 32. Ejemplo de cromatograma obtenido por CG-EM

Por ejemplo, para un pico de $t_r = 31,21$ minutos (Figura 32), el informe muestra el espectro de masas y un listado de un número predeterminado de sustancias por orden de mayor a menor similitud de sus espectros de masas correspondientes. Debe tenerse en cuenta al interpretar el informe que según la fuente de procedencia de los datos puede aparecer indistintamente alguno de los nombres comunes o el sistemático.

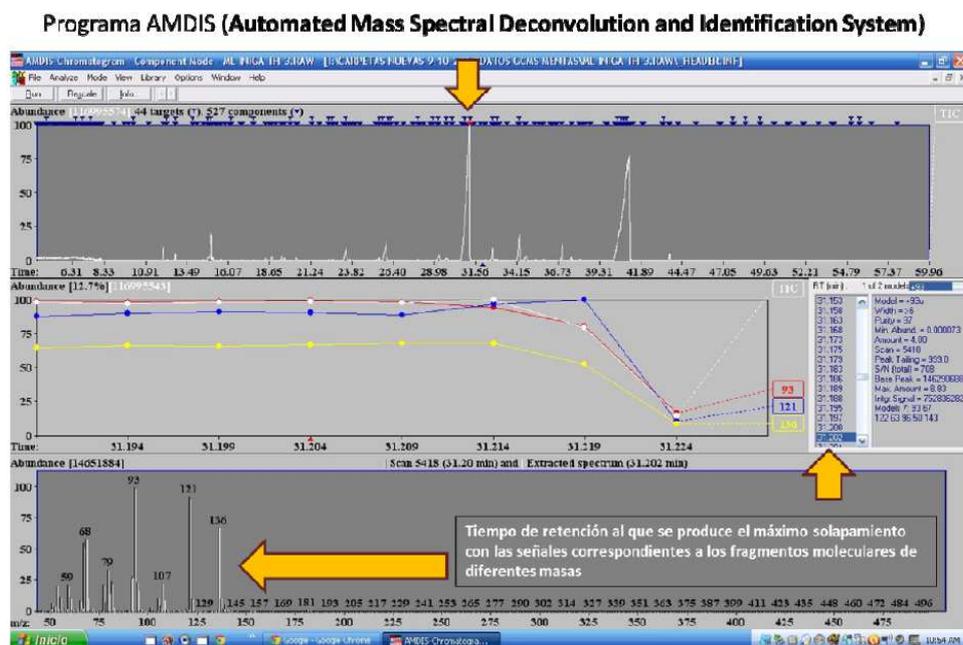


Figura 33. Captura de pantalla del AMDIS. La flecha superior es una ampliación del pico, la flecha intermedia indica el tiempo de retención y la flecha inferior es el espectro de masas del pico procedente del cromatograma

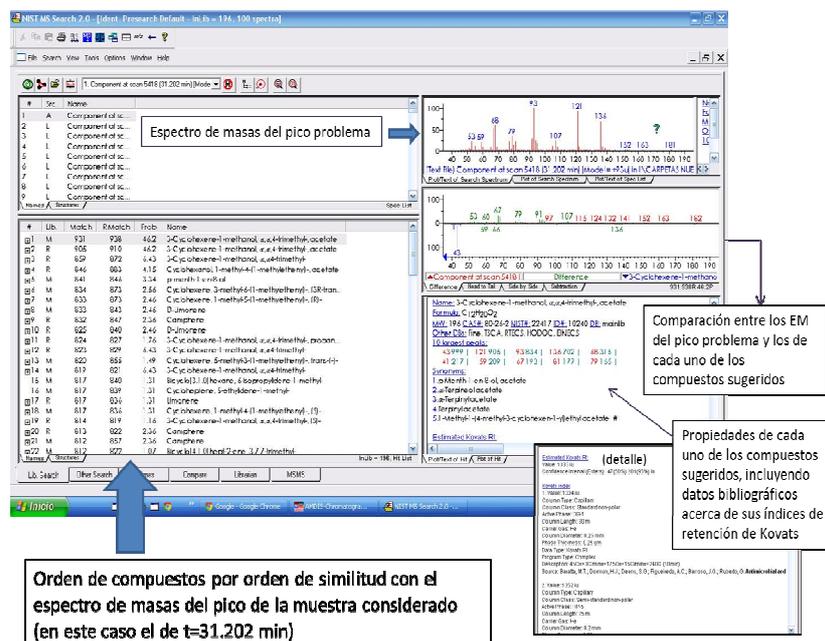


Figura 34. Captura de pantalla de NIST 2.0

La determinación del índice de Kovats sirve para discriminar entre las sustancias propuestas en las primeras posiciones. Si el tiempo de retención del pico estudiado concuerda con el IK de la librería citada, se confirma que el pico estudiado corresponde a la sustancia citada. En los casos en que se ha dispuesto de patrones puros, la confirmación de la naturaleza de los picos también se ha realizado de este modo, aumentando así la fiabilidad de la identificación.

Todo el proceso anterior nos debe conducir a una tabla como la siguiente, donde el valor de R-match, la coincidencia entre los valores de los índices de retención experimentales y de referencia, así como, en su caso, la comparación con los tiempos de retención de patrones de sustancias puras, nos permitirá la identificación de los diferentes componentes. También puede ser aconsejable añadir a esta tabla una columna en la que aparezcan los % de las áreas de los picos en el cromatograma TIC (*total ion chromatogram*), ya que la localización de los compuestos mayoritarios es una valiosa orientación a la hora de correlacionar los índices de retención obtenidos por GC-MS y los obtenidos por FID.

t_R	KI	Compuesto probable	R-match	KI bibliografía
10,171	937	alpha-pinene	852	939
12,031	976	sabinene	831	977
12,242	980	beta-pineno	891	981
12,546	986	3-octanona	855	984
12,787	990	beta-mirceno	903	991
13,497	1004	cis-3-hexenyl Acetate	940	1005
14,147	1018	alpha-terpinene	862	1017
14,532	1027	p-cymene	809	1026
14,813	1033	limonene	940	1029
14,948	1035	1,8-cineol	931	1037
...

Tabla 3. Ejemplo de tabla para la identificación de compuestos por GC/MS

3.5. MÉTODO BIOAUTOGRÁFICO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Se ha realizado siguiendo la metodología descrita por Mimica-Dukic *et al.* (2003) y Cheng y Wu (2013). Para ello, se utilizó el material y el método de trabajo ordinario empleado en la CCF pero utilizando el radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) (Santa Cruz BiotechnologyTM), en disolución metanólica 0.4 mM (metanol PANREAC, para análisis) como agente revelador.

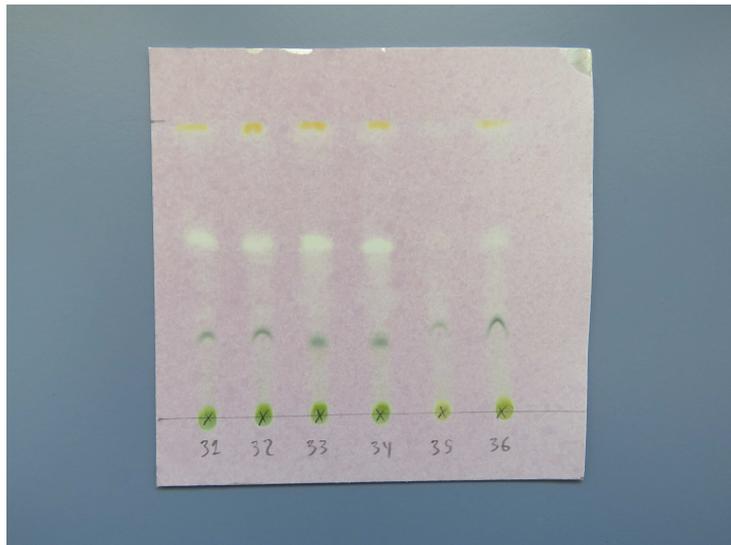


Figura 35. Cromatograma obtenido tras pulverizar con disolución metanólica de DPPH y permanecer 15 minutos secándose en vitrina de gases

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CLASIFICACIÓN DE LOS PERFILES EN CCF DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS PARA CADA UNO DE LOS INDIVIDUOS DE *MENTHA LONGIFOLIA* L. ESTUDIADOS

Se presentan a continuación los cromatogramas obtenidos clasificados según su similitud al ser revelados con vainillina y anisaldehído (ambos en disolución de ácido sulfúrico) y en el caso del anisaldehído con observación bajo radiación ultravioleta de 365 nm, tal como se describe en el apartado 3.2.4. correspondiente a material y métodos. El conjunto de todas las fotografías de los cromatogramas obtenidos puede consultarse en el anexo a este documento.

Se han identificado cinco perfiles característicos basados en la presencia de manchas características con valores determinados del factor de migración (R_f).

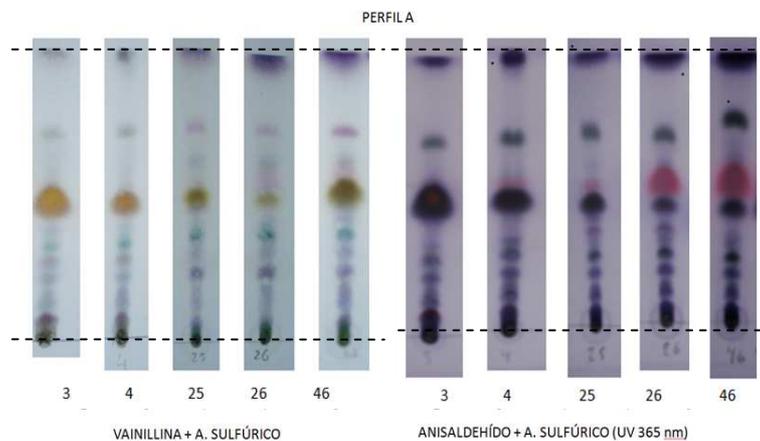


Figura 36. Imagen del perfil cromatográfico A (Manchas características para $R_f = 0.45$ (color gris-pardo con vainillina) y 0.65)

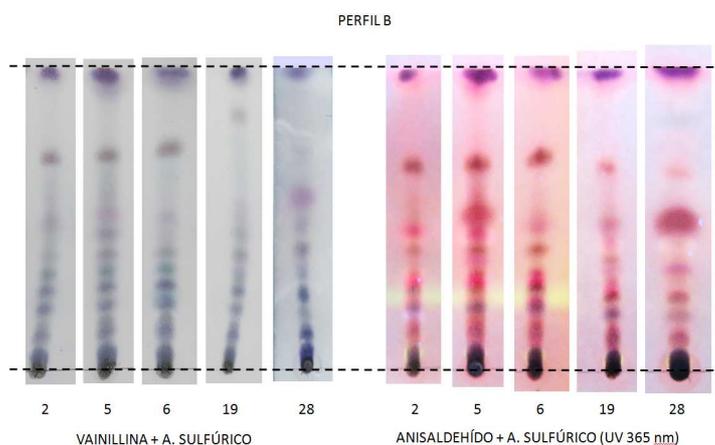


Figura 37. Imagen del perfil cromatográfico B (Manchas características para $R_f = 0.50$ y 0.70 , aproximadamente)

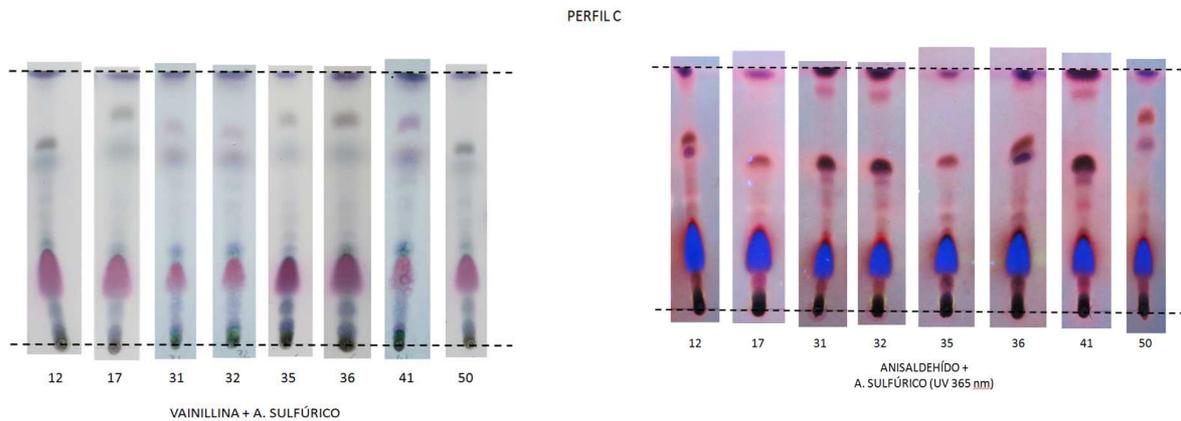


Figura 38. Imagen del perfil cromatográfico C (Mancha particularmente intensa a $R_f = 0.25$, con notable fluorescencia azul con anisaldehído bajo radiación UV a 365 nm)

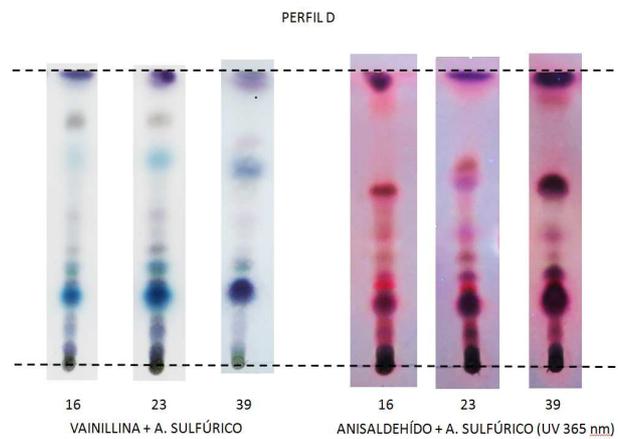


Figura 39. Imagen del perfil cromatográfico D (Mancha azul característica con vainillina a $R_f = 0.25$ y violeta intenso con anisaldehído bajo radiación UV a 365 nm)

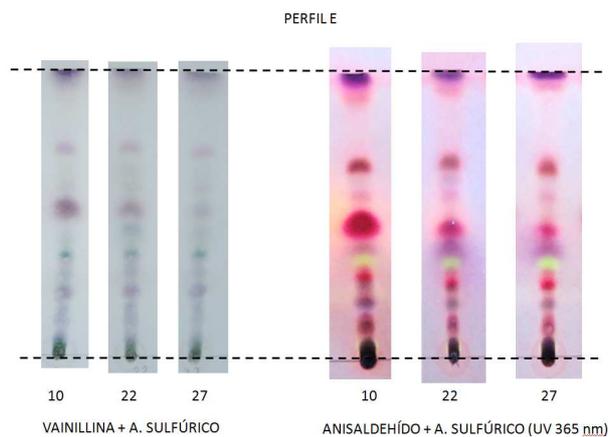


Figura 40. Imagen del perfil cromatográfico E (Mancha con fluorescencia verde brillante a $R_f = 0.35$ con anisaldehído bajo radiación UV a 365 nm)

4.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS MAYORITARIOS DE LOS ACEITES ESENCIALES OBTENIDOS A PARTIR DE LOS INDIVIDUOS DE CADA UNO DE LOS GRUPOS ESTABLECIDOS MEDIANTE CCF

Una vez realizada la clasificación de los individuos según su perfil cromatográfico en CCF se reunió el material vegetal correspondiente a cada grupo (hojas) y se procedió a la obtención del aceite esencial por hidrodestilación. Éste fue analizado por CG/MS para la identificación y cuantificación aproximada de los compuestos mayoritarios. Para cada cromatograma se incluye una tabla con los tiempos de retención, índices de retención (comparados con los referidos en la bibliografía) y % de las áreas de los picos para los compuestos mayoritarios.

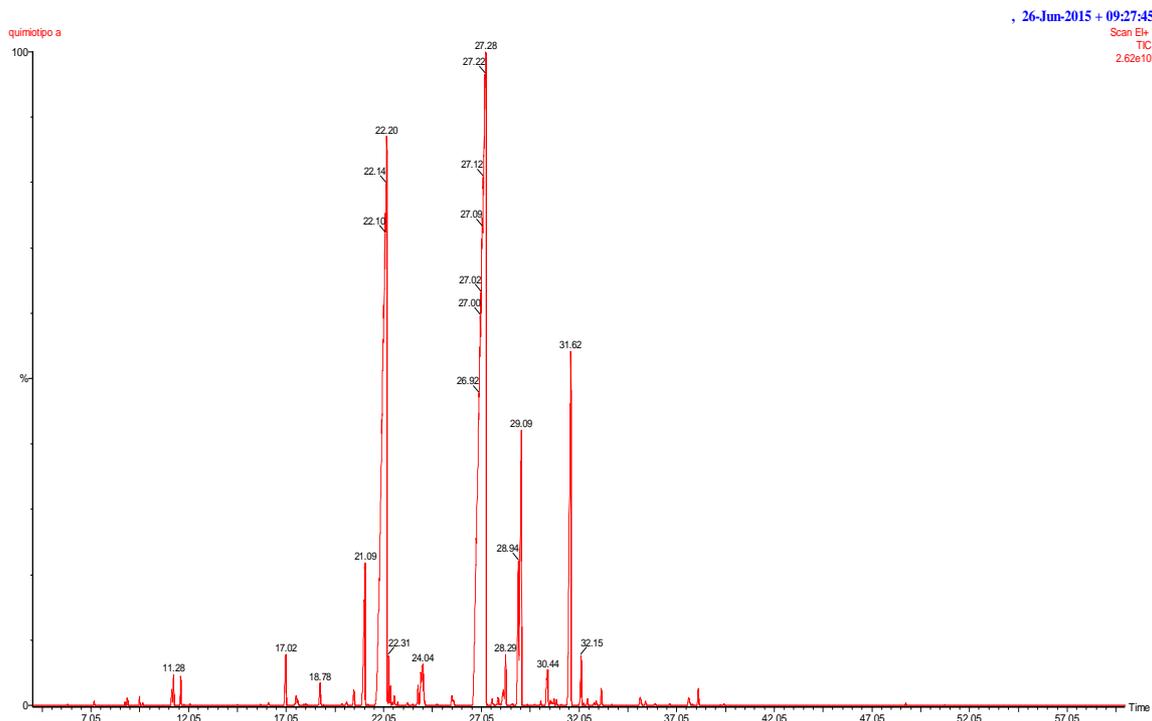


Figura 41. Cromatograma GC/MS del perfil A

<i>Mentha longifolia</i> Perfil A				
t_R	RI (Kovats)	RI (lit)	Compuestos Mayoritarios	% área T.I.C. ⁽¹⁾
21,075	1242	1237	pulegona	2,53
22,2	1267	1254-1256-1267	óxido de piperitona (cis + trans) + óxido de carvona ⁽²⁾	30,51
27,272	1381	1369	óxido de piperitenona	45,28
29,078	1424	1419	β -cariofileno	4,54
31,619	1485	1484	germacreno-D	7,17
TOTAL				90.03

- (1) T.I.C (Total Ion Chromatogram). Dichas áreas se obtienen por integración del cromatograma obtenido mediante el detector de espectroscopia de masas. Su significado difiere del obtenido con detector de ionización de llama, donde el área de los picos es proporcional al número de átomos de C, siendo una aproximación cuantitativa más adecuada. No obstante, el valor del % de las áreas en el T.I.C puede considerarse perfectamente válido para la identificación de los compuestos mayoritarios, objetivo de este trabajo.
- (2) Este pico contiene los dos isómeros geométricos del óxido de piperitona (con un índice de retención muy próximo). También se detectan a partir del espectro de masas trazas de óxido de carvona.

Tabla 4. Resultados de la identificación de compuestos de la fracción volátil del perfil A. (Los índices de Kovats de la bibliografía proceden todos de Adams (2007))

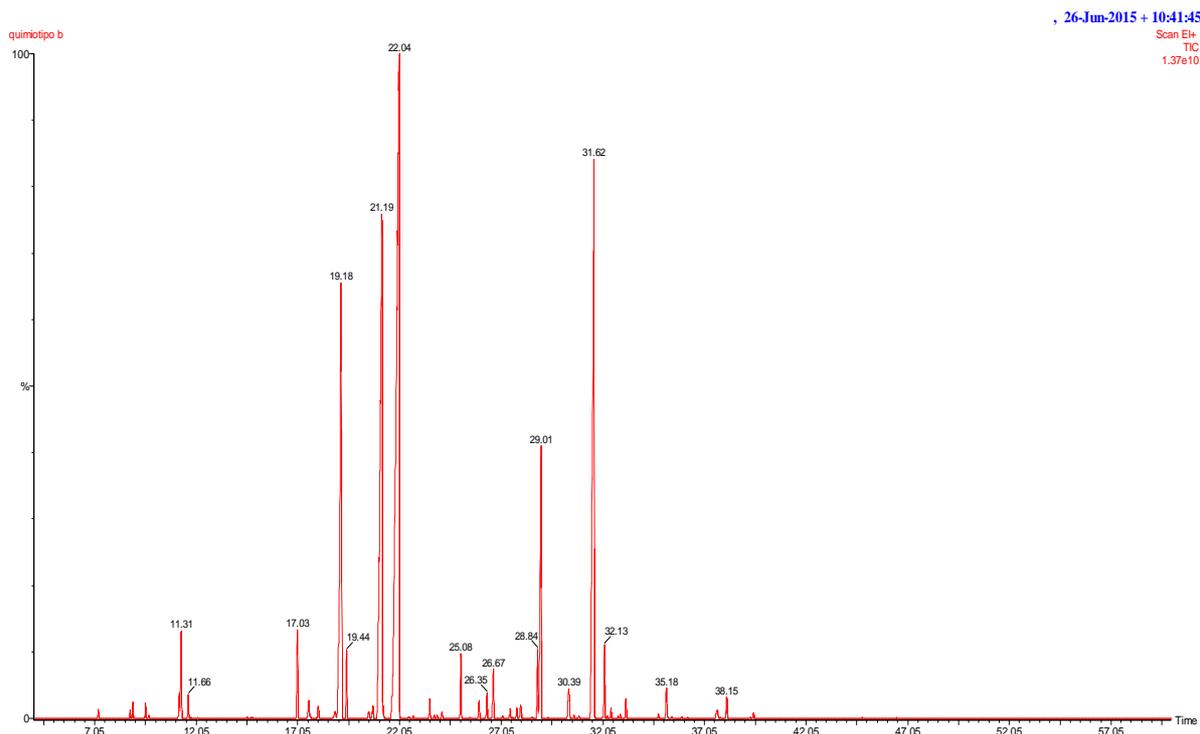


Figura 42. Cromatograma GC/MS del perfil B

<i>Mentha longifolia</i> Perfil B				
t_R	RI (Kovats)	RI (lit)	Compuestos Mayoritarios	% área T.I.C.
19,169	1198	1201	(<i>E</i>)-dihidrocarvona	12,86
21,185	1245	1237	pulegona	18,37
22,025	1263	1254	óxido de piperitona	32,40
29,008	1422	1419	β-cariofileno	5,84
31,609	1485	1484	germacreno-D	15,92
TOTAL				85,39 %

Tabla 5. Resultados de la identificación de compuestos de la fracción volátil del perfil B. (Los índices de Kovats de la bibliografía proceden todos de Adams (2007))

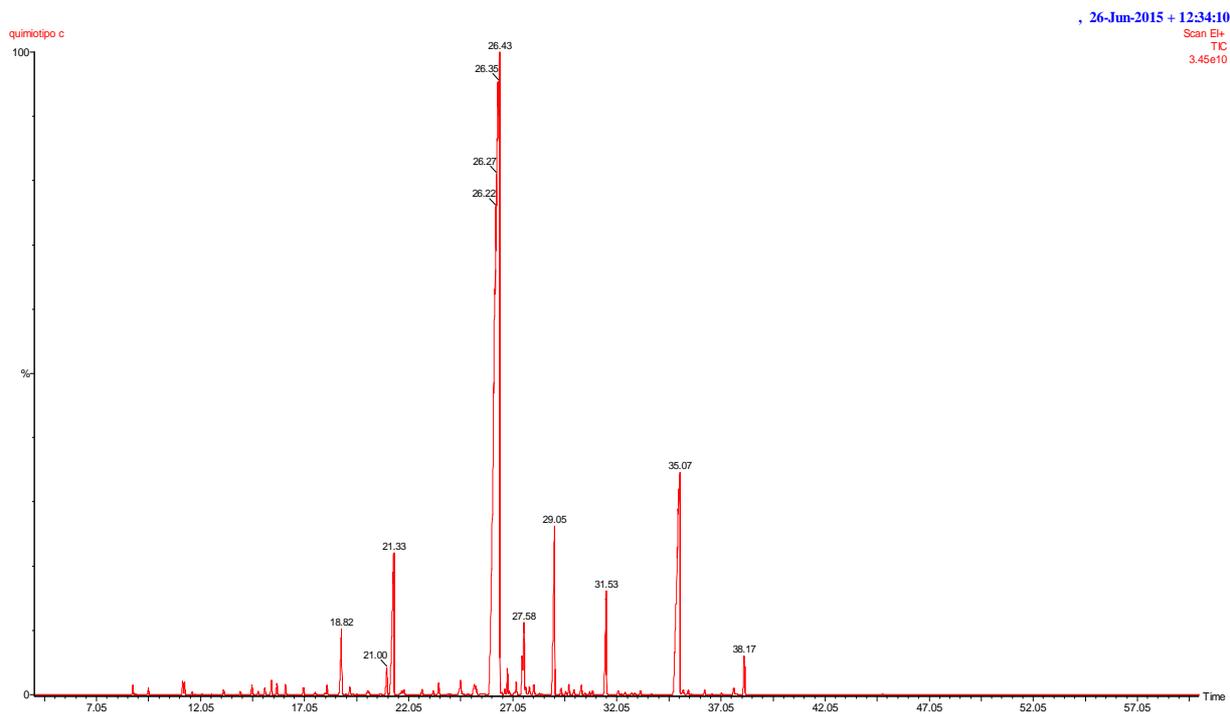


Figura 43. Cromatograma GC/MS del perfil C

<i>Mentha longifolia</i> Perfil C				
t_R	RI (Kovats)	RI (lit)	Compuestos Mayoritarios	% área T.I.C.
21,32	1248	1243	carvona	5,32
26,412	1362	1349	acetato de α -terpineol	62,41
35,06	1573	1566	acetato de carvona	12,66
29,038	1423	1419	β -cariofileno	4,67
31,524	1483	1485	germacreno-D	2,56
TOTAL				87.62

Tabla 6. Resultados de la identificación de compuestos de la fracción volátil del perfil C. (Los índices de Kovats de la bibliografía proceden todos de Adams (2007))

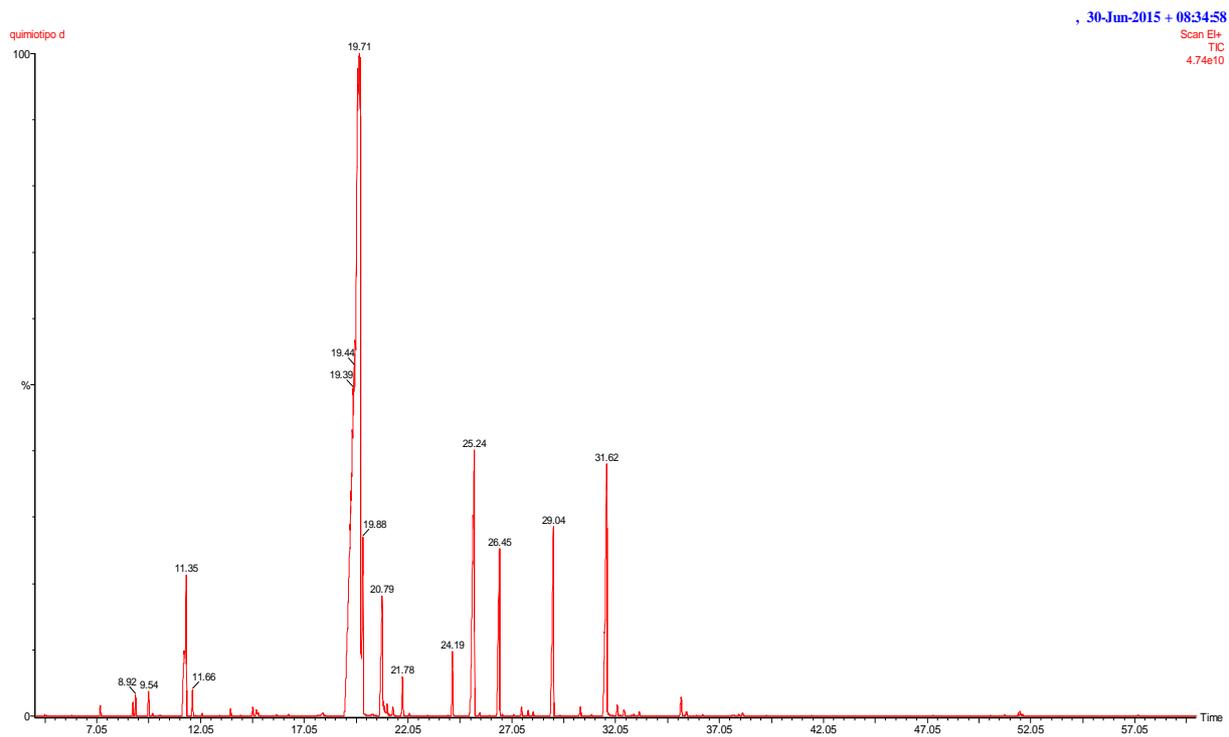


Figura 44. Cromatograma GC/MS del perfil D

<i>Mentha longifolia</i> Perfil D				
t_R	RI (Kovats)	RI (lit)	Compuestos Mayoritarios	% área T.I.C.
11,346	1035	1031	1,8-cineol	3,83
19,685	1210	1193	(Z)-dihidrocarvona	62,54
19,875	1215	1201	(E)-dihidrocarvona	3,11
20,79	1236	1220	neo-iso dihidrocarveol	2,79
25,227	1334	1325	acetato de iso dihidrocarveol	8,01
26,437	1362	1350	acetato de neo-iso dihidrocarveol	3,51
29,033	1422	1419	β -cariofileno	4,18
31,614	1485	1484	germacreno-D	6,83
TOTAL				94.80

Tabla 7. Resultados de la identificación de compuestos de la fracción volátil del perfil D. (Los índices de Kovats de la bibliografía proceden todos de Adams (2007))

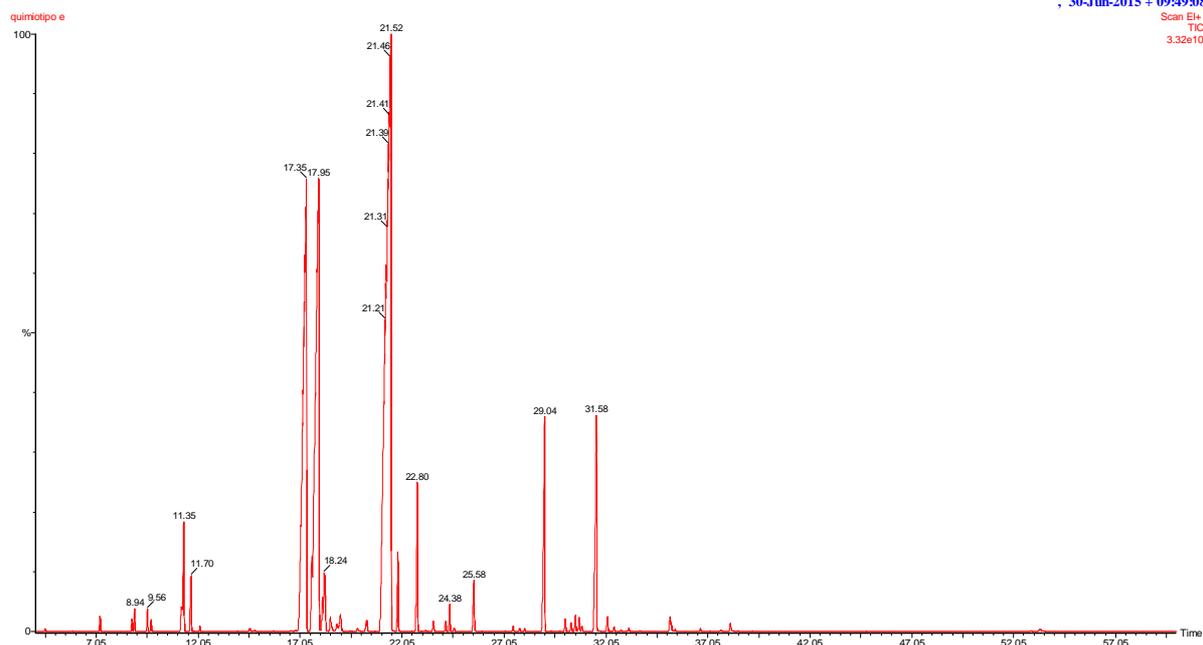


Figura 45. Cromatograma GC/MS del perfil E

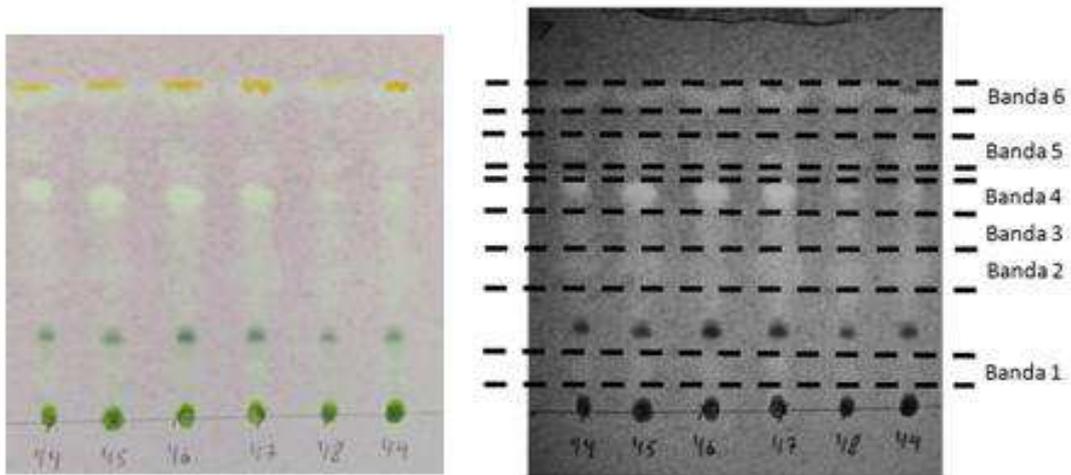
Mentha longifolia Perfil E				
t_R	RI (Kovats)	RI (lit)	Compuestos Mayoritarios	% área T.I.C.
11,336	1035	1031	1,8-cineol	1,95
17,344	1163	1163	isomentona	19,63
17,954	1175	1172	mentol	19,97
21,51	1252	1253	pulegona	38,74
22,791	1279	1274	acetato de neomentilo	2,21
29,033	1422	1419	β-cariofileno	3,86
31,579	1484	1485	germacreno-D	4,27
TOTAL				90.63

Tabla 8. Resultados de la identificación de compuestos de la fracción volátil del perfil E. (Los índices de Kovats de la bibliografía proceden todos de Adams (2007))

4.3. OBSERVACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN UNO DE LOS PERFILES CARACTERIZADOS (A) DE MENTHA LONGIFOLIA L. MEDIANTE BIOAUTOGRAFÍA CON CCF

Se muestran a continuación los resultados obtenidos por el método de CCF utilizando el reactivo DPPH (radical difenilpicrilhidrazil) para detectar los compuestos de mayor actividad antioxidante en los individuos pertenecientes al perfil A (64% del total). Tal como se describió en el apartado correspondiente de material y métodos, la identificación se ha realizado desarrollando simultáneamente dos cromatogramas en condiciones absolutamente idénticas de los individuos del perfil A (se escogieron los individuos 44-49 por ser el cromatograma en el que

se observó con mayor nitidez la decoloración del DPPH). Una vez establecidos los intervalos de Rf en que se observa decoloración, se marcan dichas zonas en el cromatograma no tratado con DPPH y se raspa la fase estacionaria de cada una de dichas zonas, extrayéndola con diclorometano. Cada uno de estos extractos es analizado mediante GC/MS para identificar las sustancias causantes de la actividad antioxidante.



Cromatogramas revelados con DPPH (en el de la derecha la fotografía se contrastó en blanco y negro para observar con mayor nitidez las zonas decoloradas)

Figura 46. Ensayo bioautográfico con DPPH a varias muestras correspondientes al quimiotipo A

Bandas	Rf
1	0,07-0,15
2	0,36-0,48
3	0,48-0,59
4	0,59-0,68
5	0,74-0,82
6	0,93-1

Tabla 9. Intervalos de Rf en los que se aprecia decoloración del DPPH

El análisis mediante GC/MS de las bandas 2, 3 y 4 mostró claramente la presencia de uno o dos compuestos puros en cada una, tal como se observa en las Figuras 47, 48 y 49.

Cromatograma GC/MS (perfil cromatográfico A, individuos 44-49)
Banda 2

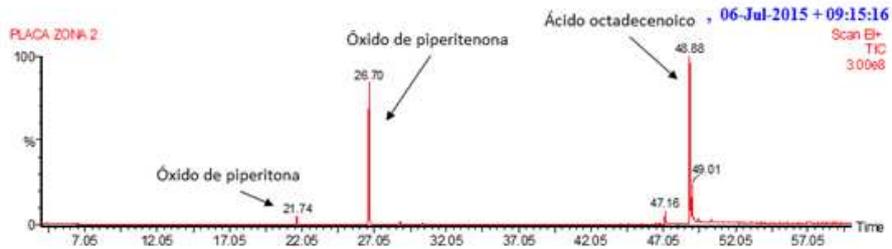


Figura 47. Cromatograma GC/MS del perfil A (Banda 2)

Cromatograma GC/MS (perfil cromatográfico A, individuos 44-49)
Banda 3

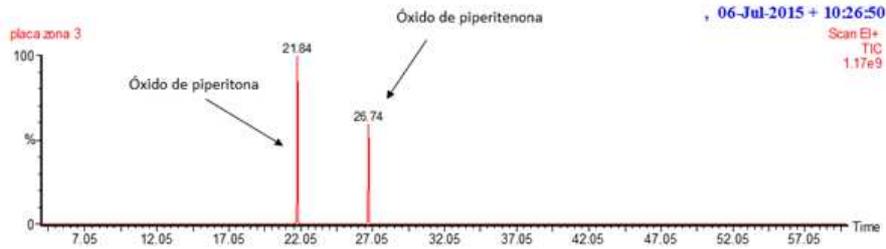


Figura 48. Cromatograma GC/MS del perfil A (Banda 3)

Cromatograma GC/MS (perfil cromatográfico A, individuos 44-49)
Banda 4

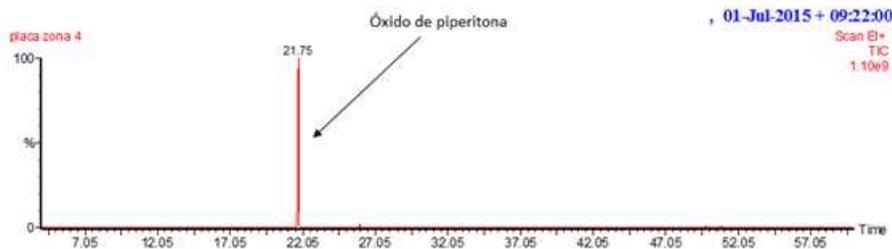


Figura 49. Cromatograma GC/MS del perfil A (Banda 4)

4.4. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

4.4.1. Caracterización de posibles quimiotipos a partir del análisis por GC/MS del aceite esencial procedente de cada uno de los perfiles cromatográficos identificados por CCF

En primer lugar, se observan en el perfil cromatográfico A como componentes mayoritarios el óxido de piperitenona (45,28%), seguido de (*Z*)-piperitona (30,51%) y en menor cantidad pulegona (2,54%). En el perfil cromatográfico B, también se ha detectado óxido de piperitona (32,40%), seguido por otros componentes como pulegona (18,37%) y (*E*)-dihidrocarvona (12,86%). El perfil cromatográfico C se caracteriza por la presencia de acetato de α -terpineol (62,41%) y en menor proporción carvona (5,32%), al igual que su derivado acetato de carvona (12,66%). En el perfil cromatográfico D el componente mayoritario es la (*Z*)-dihidrocarvona (62,54%) con su isómero geométrico (*E*)-dihidrocarvona (3,11%), así como un conjunto de isómeros del dihidrocarveol: neo-iso dihidrocarveol (2,79%), acetato iso dihidrocarveol (8,01%), acetato neo-iso dihidrocarveol (3,51%). También cabe citar el 1,8-cineol (3,83%), que es un precursor del α -terpineol. Por último, en el perfil cromatográfico E se observa una elevada proporción de pulegona (38,74%) y también otros compuestos como 1,8-cineol (1,95%), mentol (19,97%) y sus derivados como isomentona (19,63%) y acetato de neomentilo (2,21%).

A la vista de los resultados obtenidos, podemos decir que en los diferentes perfiles se han identificado compuestos mayoritarios específicos, aunque en algunos casos aparecen también, en menor proporción, en otros perfiles. Este hecho es habitual en la definición de los quimiotipos de aceites esenciales de diferentes especies: los compuestos mayoritarios en un quimiotipo aparecen como minoritarios en los demás. Por otra parte, también hay compuestos comunes a todos perfiles establecidos, que además aparecen en proporciones similares, concretamente los sesquiterpenos β -cariofileno y germacreno-D.

Cabe destacar la concordancia entre los quimiotipos A, C, y E con los definidos mediante análisis estadístico multivariante (PCA (análisis de componentes principales de la varianza) y análisis de conglomerados) en un anterior estudio realizado en poblaciones de la misma zona (Bonet, 2013). La comparación con los quimiotipos de *Mentha longifolia* establecidos en la bibliografía permite confirmar la utilidad del *screening* previo realizado mediante CCF para establecer como posibles quimiotipos los perfiles cromatográficos observados. Se hará referencia pues, en adelante, a los quimiotipos A, B, C, D y E correspondientes a dichos perfiles.

El quimiotipo A, cuyos componentes mayoritarios son los óxidos de piperitenona y de piperitona, concuerda notablemente con los descritos por Viljoen *et al.* (2006) y Pal Singh *et al.* (2008). El quimiotipo C, caracterizado por la presencia mayoritaria de acetato de α -terpineol y acetato de carvona, fue el más abundante en el citado anterior estudio (Bonet, 2013) no habiendo sido descrito hasta la fecha en la bibliografía. El quimiotipo D es notablemente similar al descrito por Dzamic *et al.* (2010), aunque sus compuestos mayoritarios (*Z*)-(*E*)-dihidrocarvona son referidos como minoritarios en muchos otros trabajos, tal como se muestra en la introducción (1.4.6.). Este quimiotipo no fue identificado anteriormente (Bonet, 2013), hecho que puede explicarse por su escasa abundancia, ya que solamente 3 individuos de los 50 estudiados mostraron este perfil. La composición del quimiotipo E, caracterizado por la presencia mayoritaria de pulegona y derivados del mentol, es también descrita por Asekun *et al.*

(2006), Hajlaoui *et al.* (2009), Mkaddem *et al.* (2009), Segev *et al.* (2012). En cuanto al perfil B, es el único difícil de considerar un quimiotipo claramente definido al presentar una proporción relativamente elevada de tres compuestos característicos de otros tres quimiotipos.

4.4.2. Aplicación de un método bioautográfico para el reconocimiento de la actividad antioxidante del aceite esencial correspondiente al quimiotipo A (óxidos de piperitona y piperitenona)

La zona del cromatograma donde se observa la máxima decoloración del DPPH es, con diferencia, la banda 4. El compuesto identificado en dicha zona es de modo prácticamente exclusivo el óxido de piperitona. También las bandas 2 y 3 muestran cierta decoloración que, a la vista de los resultados, podría atribuirse tanto al óxido de piperitona como al de piperitenona, en menor medida, y al ácido octadecenoico, identificado también en la banda 2. En cualquier caso, cabe destacar que el óxido de piperitona, no siendo el compuesto mayoritario, muestra sin embargo una elevada actividad antioxidante (al menos cualitativamente).

La actividad antioxidante de los aceites esenciales de *Mentha longifolia*, ha sido estudiada cuantitativamente por diversos autores por métodos espectrofotométricos, proporcionando datos relativos al aceite esencial como tal, sin especificar a qué compuestos puede atribuirse dicha actividad (Mkaddem *et al.*, 2009; Stanisavljevic *et al.*, 2014). En un estudio sobre tres especies del género *Mentha* (*longifolia* entre ellas) realizado por Mimica-Dukic *et al.* (2003) se aplicaron simultáneamente dichos métodos y los bioautográficos, registrándose la mayor actividad en las cetomas monoterpénicas mentona e isomentona, presentes en el quimiotipo E identificado en este trabajo.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1. La clasificación mediante CCF de los individuos procedentes de la población de *Mentha longifolia* L. estudiada ha permitido la identificación de los siguientes quimiotipos, caracterizados por los siguientes compuestos mayoritarios:
 - A: Óxidos de piperitenona y piperitona.
 - B: (*E*)-dihidrocarvona, pulegona y óxido de piperitona.
 - C: Acetato de α -terpineol y acetato de carvona.
 - D: (*Z*)-dihidrocarvona
 - E: Pulegona, mentol e isomentona.
2. Es destacable la quimiodiversidad encontrada en una población de extensión reducida y unas condiciones ambientales uniformes. Esta coexistencia de quimiotipos justifica la necesidad de aplicar metodologías basadas en el análisis de plantas individuales en las investigaciones de carácter quimiotaxonómico, así como en las relacionadas con la influencia de factores ambientales en la composición química de los aceites esenciales.
3. De los cinco quimiotipos identificados por CCF, cuatro de ellos concuerdan con otros ya identificados, tres en la bibliografía (A, D y E) y otro (C), identificado por primera vez en la población estudiada. Puede considerarse, por tanto, que la selección de individuos por el perfil químico de su aceite esencial a partir de los datos de CCF es un método rápido y fiable para la obtención y propagación de plantas que proporcionen aceites esenciales de quimiotipos determinados con una actividad biológica específica.
4. La principal ventaja de este método es la economía, tanto en tiempo como en recursos. Basta comparar las seis horas aproximadas de trabajo que costó la preparación de los cincuenta extractos para CCF y el desarrollo y visualización de los cromatogramas con el tiempo que costaría procesar las mismas muestras sometiénolas a hidrodestilación y posterior análisis por GC (podría estimarse en 75 horas el tiempo invertido, considerando la posibilidad de destilar dos muestras simultáneamente).
5. La experimentación en el aceite esencial procedente del quimiotipo A mediante el ensayo con DPPH y el posterior análisis por GC/MS del extracto obtenido, mediante CCF preparativa a partir de las zonas del cromatograma en las que se observa mayor actividad antioxidante, ha permitido identificar el óxido de piperitona (y en menor medida, el de piperitenona) como los compuestos de mayor actividad. Dado que son los mayoritarios en dicho quimiotipo, cabe esperar resultados satisfactorios cuando dicha actividad se determine cuantitativamente. La extensión de esta metodología al resto de quimiotipos permitirá en posteriores estudios dirigir la atención hacia aquellos con mayor potencial antioxidante.
6. En general, la aplicación de métodos bioautográficos a la evaluación previa de la actividad antioxidante de aceites esenciales puede ser útil para orientar la investigación cuantitativa basada en métodos espectrofotométricos a aquellos quimiotipos cuya composición sea potencialmente más activa.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

ABDALLA, A.E.; ROOZEN, J.P. (1999). Effect of plant extracts on the oxidative stability of sunflower oil and emulsion. *Food Chemistry*, 64: 323-329.

ADAMS, R. P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Illinois. 4th edition. Allured Publishing Corporation, Carol Stream. 803 pp.

AFLATUNI, A. (2005). The yield and Essential Oil content of Mint (*Mentha spp*) in Northern Ostrobothnia. Trabajo presentado en: Faculty of Science, University of Oulu, Finland. 50 pp.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; MC DONALD, S.; ROBARDS, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127: 183-198.

ASEKUN, O. T.; GRIERSON, D.S.; AFOLAYAN, A. J. (2007). *Effects of drying methods on the quality and quantity of the essential oil of Mentha longifolia L. subsp. Capensis.* *Food Chemistry*, 101: 995–998.

BERTOLI, A.; LEONARDI, M.; KRZYZANOWSKA, J.; OLESZEK, W. (2011) *Mentha longifolia in vitro* cultures as safe source of flavouring ingredients. *Acta bp*, 58 (4): 581-587.

BONET, A. (2013). Caracterización de quimiotipos de *Mentha longifolia* L. en poblaciones del valle del Jiloca (Teruel). Trabajo presentado en: Universidad Politécnica de Valencia, 145 pp.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.*, 28 (1): 25-30.

CANCIO, A.F.; ROSCALES, S.S.; MENENDEZ, E.M. (2008). Estudio preliminar de la estructura interna del subtipo fitoclimático VI (IV) 1 de Allué (1990). *Aplicaciones fitoclimáticas. For. Syst.*, 8: 11–35.

CHENG, Z.; WU, T. (2013). TLC bioautography: High throughput technique for screening of bioactive natural products. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 16 (7): 531-549.

D'ARCY, P; MALLARD, G. (2004). Automated Mass Spectral Deconvolution & Identification System (AMDIS).Technology Administration National Institute of Standards and technology (NIST).

DE-SHENG, D.; HAN-DONG, S. (1983). Structural determination of repellent principle in the essential oil of *Mentha haplocalyx* Briq., *Journal of Integrative Plant Biology*, 25 (1).

DŽAMIC, A. M.; SOKOVIĆ, M. D.; RISTIĆ, M. S.; NOVAKOVIĆ, M.; JOVANOVIĆ, S. G.; TEŠEVIĆ, V.; MARIN, P. D. (2010). Antifungal and antioxidant activity of *Mentha longifolia* (L.) Hudson (Lamiaceae) essential oil. *Botanica SERVICA*, 34: 57-61.

FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G.; SCHEFFER, J. J. C. (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 23: 213–226.

FLEISHER, A.; FLEISHER, Z. (1991). The Essential Oils from *Mentha longifolia* Growing in Sinai and Israel. *Journal of Essential Oil Research*, 3: 57-58.

GARCIA VALLEJO, M. I.; GARCIA VALLEJO, M. C.; VELASCO, A. (1987). VII Congreso Nacional de Química (Química Agrícola y Alimentaria 2). Sevilla.

GOBERT, V.; MOYA, S.; COLSON, M.; TABERLET, P. (2002). Hybridization in the section *Mentha* (Lamiaceae) inferred from AFLP markers. *Am. J. Bot.* 89: 2017-2023.

GULLUCE, M.; SAHIN, F.; SOKMEN, M.; OZER, H.; DAFERERA, D.; SOKMEN, A.; POLISSIOU, M.; ADIGUZEL, A.; OZKAN, H. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *Longifolia*. *Food Chemistry*, 103: 1449-1456.

HAJLAOUI, H.; SNOUSSI, M.; FALLAH, H.; KSOURI, R.; BAKHROUF, A. (2008). Comparison of chemical composition and antimicrobial activities of *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia* essential oil from two Tunisian localities (Gabes and Sidi Bouzid). *Annals of Microbiology*, 58: 513-520.

HAJLAOUI, H.; TRABELSI, N.; NOUMI, E.; SNOUSSI, M.; FALLAH, H.; KSOURI, R.; BAKHROUF, A. (2009). Biological activities of the essential oils and the methanol extract of two cultivated mint species (*Mentha longifolia* and *Mentha pulegium*) used in the Tunisian folkloric medicine. *World Journal Microbiol Biotechnol*, 25: 2227-2238.

HARLEY, R.; BRIGHTON, C. A. (1977). Chromosome numbers in the genus *Mentha* L. *Bot. J. Linnean Soc.* 74: 1-96.

HUSSAIN, A. I.; ANWAR, F.; NIGAM, P. S.; ASHRAF, M.; GILANI, A. H. (2010). Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. *J. Sci Food Agric*, 90: 1827-1836.

KOKKINI, S.; KAROUSOU, R.; LANARAS, T. (1995). Essential Oils of Spearmint (Carvone-rich) Plants from the Island of Crete (Greece). *Biochemical Systematics and Ecology*, 23 (4): 425-430.

LAWRENCE, B. M. (2006). *Mint. The genus Mentha*, en: *Mentha: An Overview of Its Classification and Relationships*. Ed. CRC Press. New York. 558 pp.

MABBERLEY, D. (1997). *The Plant-Book*. Cambridge University Press. Cambridge. 858 pp.

MAFFEI, M. (1988). A chemotype of *Mentha longifolia* (L.) hudson particularly rich in piperitenone oxide. *Flavour and Fragrance Journal*, 3: 23-26.

MASTELIC, J.; JERKOVIC, I. (2002). Free and glycosidically bound volatiles of *Mentha longifolia* growing in Croatia. *Chemistry of Natural Compounds*, 38 (6).

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P. R.; VAN BEEK, T. A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85 (2): 231-237.

MIMICA-DUKIC, N.; BOZIN, B.; SOKOVIC, M.; MIHAJLOVIC, B.; MATAVULJ, M. (2003). Antimicrobial and Antioxidant Activities of Three *Mentha* Species Essential Oils. *Planta Medica*, 69 (5): 413-419.

MKADDEM, M.; BOUAJILA, J.; ENNAJAR, M.; LEBRIHI, A.; MATHIEU, F.; ROMDHANE, M. (2009). Chemical Composition and Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Mentha (longifolia* L. and *viridis*) Essential Oils. *Journal of Food Science*, 74 (7): 358-363.

MOLYNEUX, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 26 (2): 211-219.

MORADALIZADEH, M.; KHODASHENAS, M.; AMIRSEIFADINI, L.; GANJEHKAVIRI, M. (2014). Identification of chemical compounds in essential oils from stems, leaves and flowers of *Mentha longifolia* var. *kermanensis* by GC/MS. *International Journal of Biosciences (IJB)*, 4 (6): 117-121.

PAL SINGH, H.; BATISH, D. R. MITTAL, S.; DOGRA, K. S.; YADAV, S; KOHLI, R.K. (2008). Constituents of leaf essential oil of *Mentha longifolia* from India. *Chemistry of Natural Compounds*, 44 (4).

RASOULI, I.; REZAEI, M. B. (2002). Bioactivity and chemical essential oil of *Zataria Multiflora* y *Mentha longifolia* (L. HUDS). *Revista de Optimización Global*, 24: 141-146.

SALEH, M. A.; CLARK, S.; WOODARD, B.; DEOLU-SOBOGUN, S. A. (2010). Antioxidant and free radical scavenging activities of essential oils. *Ethnicity Disease*, 20: 78-82.

SÁNCHEZ-MORENO, C. (2002). Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci. Tech. Int.*, 8 (3): 121-137.

SEGEV, D.; NITZAN, N.; CHAIMOVITSH, D.; ESHEL, A.; DUDAI, N. (2012). Chemical and morphological diversity in wild populations of *Mentha longifolia* in Israel. *Chemistry & biodiversity*, 9 (3): 577-588.

SHAROPOV, F. S.; SULAIMONOVA, V. A.; SETZER, W. N. (2012). Essential oil composition of *Mentha longifolia* from wild populations growing in Tajikistan. *Journal of Medicinally Active Plants*, 1 (2):76-84.

SORIA, A. C.; ESTEBAN, J.; MORALES, R.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J.; SANZ, J. (2008). Validación estadística de la presencia en plantas de quimiotipos caracterizados por la concentración de componentes volátiles obtenida mediante GC-MS. *Botanica Complutensis*, 32: 225-236.

SCHWARZ, K.; BERTELSEN, G.; NISSEN, L.R.; GARDNER, P.T.; HEINONEN, M.I.; HOPIA, A.; HUYNH-BA, T.; LAMBELET, P.; MCPHAIL, D.; SKIBSTED, L.H.; TIJBURG, L. (2001). Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *Eur. Food Res. Technol.*, 212: 319-328.

STANISAVLJEVIĆ, D.; DORDEVIĆ, S.; MILENKOVIĆ, M.; LAZIĆ, M.; VELICKOVIĆ, D.; RANDELOVIĆ, N.; ZLATKOVIĆ, B. (2014). Antimicrobial and Antioxidant Activity of the Essential Oils Obtained from *Mentha longifolia* L. Hudson, Dried by Three Different Techniques. *Records of Natural Products*, 8 (1): 61-65.

VILJOEN, A. M.; PETKAR, S.; VAN VUUREN, S. F.; FIGUEREIDO, A. C.; PEDRO, L. G.; BARROSO, J. G. (2006). The Chemo-Geographical Variation in Essential Oil Composition and the Antimicrobial Properties of “Wild Mint” – *Mentha longifolia* subsp. *polyadena* (Lamiaceae) in Southern Africa. *Journal of Essential Oil Research*, 18: 60-65.

WAGNER, H.; BLADT, S. (2001). *Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas*. Springer, 384 pp.

BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

RIVAS-MARTÍNEZ, S. (2008). Worldwide Bioclimatic Classification System. Phytosociological Research Center, Spain. Disponible en http://www.globalbioclimatics.org/book/bioc/bioc_2008_02.pdf [Consulta el 5 de Julio de 2015]

Páginas Web:

<http://www.asturnatura.com/especie/mentha-longifolia.html> [Consulta el 10 de Junio de 2015]