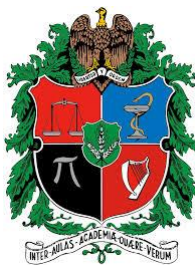


**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACEITE ESENCIAL FOLIAR EXTRAÍDO DE ESPECIES DE OREGANO (*Origanum vulgare*), OREGANO “BORDE BLANCO” (*Origanum vulgare ssp*) Y OREGANITO (*Lippia alba mill*) CULTIVADO EN LA ZONA NORTE DEL DEPARTAMENTO DE BOLÍVAR (COLOMBIA)**

**MILADYS ESTHER TORRENEGRA ALARCON**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA AGRICOLA Y DE ALIMENTOS  
AREA CURRICULAR DE AGROINGENIERIA Y ALIMENTOS  
MAESTRIA EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, EN CONVENIO CON LA  
UNIVERSIDAD DE CARTAGENA  
CARTAGENA DE INDIAS D. T. Y C, BOLÍVAR  
JUNIO, 2014**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACEITE ESENCIAL FOLIAR EXTRAIDO DE ESPECIES DE OREGANO (*Origanum vulgare*), OREGANO “BORDE BLANCO” (*Origanum vulgare ssp*) Y OREGANITO (*Lippia alba*) CULTIVADO EN LA ZONA NORTE DEL DEPARTAMENTO DE BOLÍVAR (COLOMBIA)**

**MILADYS ESTHER TORRENEGRA ALARCON**

**Trabajo de grado presentado para optar el título de Magister en Ciencias y Tecnología de Alimentos**

**Director  
JESUS GIL GONZALEZ  
PhD Ciencias Químicas**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA AGRICOLA Y DE ALIMENTOS  
AREA CURRICULAR DE AGROINGENIERIA Y ALIMENTOS  
MAESTRIA EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, EN CONVENIO CON LA  
UNIVERSIDAD DE CARTAGENA  
CARTAGENA DE INDIAS D. T. Y C, BOLÍVAR  
JUNIO, 2014**

Nota de aceptación:

---

---

---

---

---

---

---

Firma del presidente del Jurado

---

Firma del Jurado

---

Firma del Jurado

Medellín, Junio de 2014

## DEDICATORIA

*Agradezco primeramente a Dios por haberme permitido lograr esta gran meta en mi vida y dedico este trabajo de investigación a mis padres: Domingo Ramón Torrenegra Villa (Q.P.D), Emperatriz María Alarcón y el gran amor de mi vida mi hija Johana Didotid, que me han brindado mucho amor, comprensión y apoyo en este gran camino a mi superación personal y profesional, al igual que toda mi familia en especial a Eli y Coki. y amigos.*

## AGRADECIMIENTOS

La autora expresa sus agradecimientos a las siguientes personas y entidades que de una u otra forma hicieron posible el desarrollo de la presente investigación:

Agradezco a los Doctores Gabriel Acevedo, Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Cartagena y al Ingeniero Jaime Pérez Mendoza, Director programa de Ingeniería de Alimentos de la Universidad de Cartagena, por su apoyo incondicional en la culminación de este proyecto.

Un agradecimiento muy especial al Doctor Jesús Gil González, Director del proyecto de investigación, Universidad Nacional Sede Medellín, por su acertada dirección y dedicación.

A mi gran amigo Clemente Granados Conde, Ingeniero de Alimentos, docente del Programa de Ingeniería de Alimentos de la Universidad de Cartagena y Director del grupo de investigación de Ingeniería, innovación, Calidad Alimentaria y Salud (INCAS), por su valiosa asesoría en el proyecto.

Asimismo, a los profesores: Germán Eduardo Matiz Melo, Ph.D en Ciencias Farmacéuticas y Director del grupo de Investigación en Tecnología Farmacéutica, Cosmética y de Alimentos "GITFCA" de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Cartagena y a la Dra. María del Rosario Osorio Fortich, MsC en Ciencias Biomédicas. Docente de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Cartagena e investigadora del grupo de Investigación en Tecnología Farmacéutica, Cosmética y de Alimentos GITFCA, por su gran apoyo y colaboración.

A mi gran amigo Glicerio León Méndez. Químico Farmacéutico. Investigador del grupo de Investigación en Tecnología Farmacéutica, Cosmética y de Alimentos "GITFCA", Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Cartagena; por su apoyo, perseverancia y compromiso en este proyecto.

Al Dr. Francisco Contreras, Gerente de la Planta Extractora María La Baja S.A, por su gran apoyo y aporte al proyecto.

A los docentes Luis Franco Peña. Ph.D en Ciencias Biomédicas y Director del grupo de evaluación Biológica de Sustancias Promisorias “GESP” de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Cartagena y al Dr. Jairo Mercado Camargo, MsC en Química. Docente de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Cartagena e investigadora del grupo de Investigación en Química y Medicamentos.

Al Docente Eduardo Arguello. Químico Farmaceuta. Docente de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Cartagena, por su colaboración y orientación en la investigación.

Al Dr. Rafael González. PhD en Biotecnología. Docente del Programa de Ingeniería de Alimentos, Universidad de Cartagena, gracias por su apoyo en la parte estadística.

A mi gran amigo Antonio Carlos Bustillo Simancas. Ingeniero Agrónomo. Especialista en Agroecología y desarrollo Rural, desarrollo Sostenible aplicado a los Sistemas Agrarios; por su apoyo, perseverancia y compromiso en este proyecto.

A mi amigo y colaborador Álvaro Andrés Álvarez. Tecnólogo en Control de Calidad en Alimentos; por su apoyo y compromiso en la investigación.

A mis amigos Luis Monroy, Ing. Químico, Msc (C) en Ciencia y tecnología de alimentos y José Palacín. , Msc (C) en Ciencia y tecnología de alimentos; por su apoyo y compromiso en la investigación.

A los señores de la tercera edad, cultivadores de orégano del corregimiento de Membrillal, por su colaboración, compromiso y aporte en la investigación.

A mis compañeros y amigos de generación, Carmen, Luis Gabriel, Olga Lucía, José Jaime, Marcos, Luis, Betty, Ángel, Olga Tatiana, Adriana, Ronald, Zoraya, Lersy, Giovany, Ingrid, gracias por compartir este camino conmigo y en especial a Luis Monroy, José Palacín y Domingo Teherán, por su apoyo y su gran amistad.

Agradezco también a las Universidades de Cartagena y la Universidad Nacional Sede Medellín, por su apoyo logístico e institucional y a todas aquellas personas que me colaboraron de una u otra forma a cumplir este gran logro.

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE CUADROS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE ABREVIATURAS	
GLOSARIO	
RESUMEN	
INTRODUCCION	
1.0 MARCO DE REFERENCIA	19
1.1 DEFINICIÓN Y COMPOSICIÓN DE ACEITES ESENCIALES	19
1.2 CLASIFICACION DE LOS ACEITES ESENCIALES	20
1.3 IMPORTANCIA DE LOS ACEITES ESENCIALES	20
1.3.1 Producción mundial y local de AE	22
1.3.2 Extracción de AE	22
1.3.2.1 Extracción por hidrodestilación por arrastre con vapor	23
1.3.2.2 Hidrodestilación asistida por la radiación con microondas (HDM)	24
1.4 CONTROL DE CALIDAD DE LOS ACEITES ESENCIALES	24
1.4.1 Índice de refracción	24
1.4.2 Solubilidad	24
1.4.3 Densidad	25
1.5 ANÁLISIS DE LOS ACEITES ESENCIALES	25
1.5.1 Cromatografía de gases	26

1.5.2	Cromatografía de gases-espectrometría de masas	27
1.5.2.1	Espectrometría de masas	27
1.6	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	28
1.6.1	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	30
1.6.1.1	Métodos que miden la capacidad para secuestrar radicales	30
1.6.1.2	DPPH (Ensayo actividad antiradicalaria)	30
1.6.1.2.1	Catión-radical ABTS+.	32
1.6.1.2.2	ORAC (Capacidad de absorbanza del radical oxígeno)	33
1.6.2	GENERALIDADES DEL OREGANO ( <i>Origanum vulgare</i> )	34
1.6.2.1	Composición química de los aceites esenciales del orégano	36
1.6.3	Actividad biológica de los componentes del orégano	40
1.7	ESPECIES DE OREGANO DE LA ZONA NORTE DEL DEPARTAMENTO DE BOLÍVAR: OREGANO ( <i>Origanum vulgare</i> ), OREGANO “BORDE BLANCO” ( <i>Origanum vulgare</i> ssp) Y OREGANITO ( <i>Lippia alba</i> mill)	41
1.7.1	Estudio botánico	41
1.8	PALMA DE ACEITE ( <i>Elaeis guineensis</i> )	43
1.8.1	Generalidades	43
1.8.2	Características del aceite rojo de palma	44
1.8.2.1	Propiedades químicas	44
1.8.2.2	Alteración de la materia grasa en la elaboración de alimentos	45
1.8.2.3	Calidad del aceite de palma	47
1.8.2.4	Uso de antioxidantes para mantener la calidad del aceite comestible de palma	49



1.8.2.5	Propiedades nutricionales	51
2	OBJETIVOS	52
2.1	OBJETIVO GENERAL	52
2.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS	52
3	METODOLOGÍA	54
3.1	OBTENCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES (AE) DE LAS DIFERENTES VARIETADES DE ORÉGANO Y DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	55
3.1.1	Recolección del material vegetal	55
3.1.2	Procesamiento del material vegetal	56
3.1.3	Extracción del AE	56
3.1.4	Determinación de propiedades físicas del AE	57
3.2	DETERMINACION DE LOS COMPONENTES MAYORITARIOS DEL AE MEDIANTE CROMATOGRAFIA GASEOSA-ESPECTROMETRIA DE MASAS (GC/MS).	57
3.3	MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS AE	58
3.3.1	Método Del Radical DPPH•	58
3.3.2	Método Del Radical ABTS.+	59
3.3.3	Método ORAC	59
3.3.4	Empleo del AE como preservantes de la oxidación de una matriz alimentaria lipídica.	60
3.3.5	Análisis de resultados	64
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	64
4.1	RENDIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL Y PROPIEDADES FÍSICAS	64
4.2	ANÁLISIS DE LOS COMPONENTES MAYORITARIOS DE LOS AE REALIZADO POR EL MÉTODO DE HIDRODESTILACIÓN POR ARRASTRE DE VAPOR E HIDRODESTILACION ASISTIDA POR MICROONDAS	67

4.3	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	70
4.4	APLICACIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES A UNA MATRIZ ALIMENTARIA	76
	CONCLUSIONES	85
	RECOMENDACIONES	86
	BIBLIOGRAFIA	87
	ANEXOS	106

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Parámetros analíticos utilizados en el control de calidad de los AE.	25
Tabla 2. Superficie Cultivada y Distribución Geográfica del Cultivo de Orégano en Colombia.	34
Tabla 3. Características de varios tipos de orégano	36
Tabla 4. Características fisicoquímicas destacables de un aceite de palma de excelente calidad	48
Tabla 5. Rendimiento y propiedades físicas de los AE de las especies seleccionadas, aplicando el método de hidrodestilación por arrastre de vapor (HD) e hidrodestilación asistida por microondas (HDM).	64
Tabla 6. Análisis de los componentes mayoritarios presentes en los AE obtenidos mediante hidrodestilación por arrastre con vapor e hidrodestilación asistida por microondas.	67
Tabla 7. Control de calidad realizado al aceite crudo de palma en la planta extractora de Aceite de Maríalabaja S.A.	75
Tabla 8. Análisis fisicoquímico realizado al aceite crudo de palma suministrado por la empresa extractora de Aceite de María la baja S.A	77

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Reacción de transferencia de electrones del compuesto polifenólico (A) sobre el radical DPPH.	31
Figura 2. Generación del catión-radical ABTS+.	32
Figura 3. Reacción del radical AAPH durante el ensayo ORAC.	33
Figura 4. Condiciones óptimas para el cultivo del orégano.	34
Figura 5. Algunos compuestos químicos presentes en los aceites esenciales de orégano.	35
Figura 6. Flavonoides usuales presentes en las plantas de orégano.	38
Figura 7. Especies y subespecies de orégano cultivadas en la Zona Norte del departamento de Bolívar.	39
Figura 8. Composición porcentual de los ácidos grasos presentes en el aceite rojo de palma africana.	43
Figura 9. Mecanismo de la autoxidación, del aceite de palma.	45
Figura 10. Diagrama de bloques de la metodología de trabajo desarrollada durante el proyecto.	46
Figura 11. Actividad antioxidante expresada como IC50 de los aceites esenciales evaluados por el método DPPH y ABTS.	54
Figura 12. Actividad antioxidante de los AE determinada por el método ORAC Hidrofilico y Lipofílico.	70
Figura 13. Cambios en el índice TBAR del aceite de palma crudo, conteniendo diferentes cantidades de AE obtenido por HD, y almacenado a 63 °C durante 18 días.	74
Figura 14. Cambios en el índice TBAR del aceite de palma crudo, conteniendo diferentes cantidades de AE obtenido por HDM, y almacenado a 63 °C durante 18 días.	77

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AAPH:** (2, 2-azobis (2 amidino-propano) dihidrocloruro).

**ABTS<sup>+</sup>:** ácido 2,2'-azino-bis-(3-etiltiazolinabencenosulfónico- 6)

**AE:** aceites esenciales

**AOAC:** Sociedad Americana de Químicos Analistas

**AUC:** área bajo la curva de descenso para la cuantificación

**BHA:** butilato de hidroanisilo

**BHT:** butilhidroxitolueno

**CG-EM:** cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

**DES:** Destilación-extracción con solvente

**DPPH:** radical 2,2-difenil-1-picril-hidracilo

**EM:** Espectros de masas

**ERO:** especies reactivas de oxígeno

**FDA:** Administración de Medicamentos y Alimentos

**FID:** ionización en llama

**FSC:** Head-space (HS) y Destilación con Fluidos supercríticos

**GC-MS:** cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

**HD:** Hidrodestilación

**HDM:** Hidrodestilación asistida por la radiación con microondas

**MA:** malonaldehído

**MSD:** selectivo de masas

**ORAC:** capacidad de absorbancia del radical oxígeno

**RL:** Radicales libres

**RPE:** resonancia paramagnética electrónica

**SFE:** extracción con fluido supercrítico

**TBARS:** sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

**TBHQ:** *ter*-butilhidroquinona

**TEAC:** capacidad antioxidante expresada en equivalentes Trolox

**TROLOX:** ácido 6-hidroxi-2,5,7,8- tetrametil- cromán-2-carboxílico

**USDA:** Departamento de agricultura de los EE.UU

## RESUMEN

Los antioxidantes alimentarios son sustancias que pueden impedir, retrasar o inhibir las oxidaciones catalíticas y los procesos que inducen la formación de radicales libres en los alimentos y bebidas. Actualmente existe un gran interés en los aditivos naturales que posean propiedades antioxidantes, y en los últimos años se han estudiado muchas especies vegetales como fuentes potenciales de antioxidantes, entre ellas se destacan varias plantas aromáticas y especias. Comúnmente, se determina la capacidad de retardar el proceso de peroxidación de los lípidos presentes en los aceites y alimentos grasos, donde además se considera la tendencia de los consumidores la cual se inclina hacia el consumo de alimentos libres de productos y aditivos alimentarios provenientes de la síntesis química (neutralizantes, preservantes, antioxidantes, colorantes y saborizantes).

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo extraer, caracterizar y evaluar la capacidad antioxidante de los aceites esenciales (AE) obtenidos de las especies vegetales *Origanum vulgare*, *Origanum vulgare ssp* y *Lippia alba mill*, cultivadas en la región norte del departamento de Bolívar (Colombia). Los AE fueron obtenidos mediante la hidrodestilación (HD) e hidrodestilación asistida por la radiación con microondas (HDM). La especie *Lippia alba mill* N.E. Brown presentó los mayores rendimientos con valores entre 0.1 – 0.15%, las demás especies exhibieron rendimientos inferiores a 0.1%. Los AE obtenidos fueron analizados mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). El compuesto mayoritario encontrado en todas las muestras fue el carvacrol, siendo la especie *Origanum vulgare ssp* (orégano borde blanco) la que presentó el mayor porcentaje (69.97%) cuando se empleó el método de HDM. La actividad antioxidante de los AE fue determinada mediante técnicas de actividad antiradicalaria por los métodos DPPH, ABTS y ORAC. Se observó que el AE obtenido de las especies *Origanum vulgare* y *Origanum vulgare ssp*, presentaron una capacidad antioxidante similar a la del estándar de ácido ascórbico. La mayor capacidad antioxidante se observó con el AE proveniente de *Origanum vulgare ssp* (orégano borde blanco) obtenido por el método de HDM. Adicionalmente, este aceite, a una concentración de 150 µg/mL, disminuyó la oxidación del aceite crudo de palma almacenado durante 18 días a 63 °C.

**Palabras claves:** Capacidad antioxidante, oxidación lipídica, aceite de palma, orégano

## ABSTRACT

Food antioxidants are substances that can prevent, delay or inhibit the catalytic oxidation and processes that induce the formation of radical free food and drinks. There is currently a great interest in the natural additives that have antioxidant properties, in recent years we have studied many plant species as potential sources of antioxidants, these include various herbs and spices, studies commonly determines the ability to slow down the process of peroxidation of lipids present in oils and fatty foods. The consumer trend leans toward the consumption of food additives and products free food from chemical synthesis (neutralizing agents, preservatives, antioxidants, dyes and flavorings).

Present research work aimed to extract, characterize and evaluate the antioxidant capacity of essential oils obtained from species vegetables *Origanum vulgare*, *Origanum vulgare* ssp and *Lippia alba* Mill, grown in the northern region of the Department of Bolívar (Colombia). AE were obtained through the distillation (HD) and radiation with microwave (HDM),-assisted hydrodistillation species *Lippia alba* Mill N.E. Brown, presented the highest yields with values between 0.1-0.15% respectively, other species exhibited yields less than 0.1%. AE obtained were analyzed using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). The majority compound found in all was carvacrol, *origanum vulgare* ssp (white edge oregano) presented the highest percentage, with a value of 69.97%, determined using the method of HDM. The antioxidant activity of AE, was determined using the techniques of antiradicalaria activity by DPPH, ABTS, and ORAC methods. It was observed that the AE obtained from *Origanum* species *vulgare* and *Origanum vulgare* ssp, presented an antioxidant capacity similar to the standard of Ascorbic acid. The highest antioxidant capacity was observed with the coming AE of *Origanum vulgare* ssp (white edge oregano), obtained by the method of HDM, this material decreased the oxidation of crude palm oil during storage at 63 ° C, for 18 days at a concentration of 150 PPM.

**Keywords:** Antioxidant, oxidation, palm oil,



## INTRODUCCIÓN

Colombia es un país que posee una gran diversidad de ecosistemas y microclimas, lo cual hace que su vegetación sea muy variada, enriquecida con especies endémicas y diversidad genética muy alta. Algunas de las plantas que se pueden encontrar poseen AE con principios activos y actividad biológica y/o industrial, con amplias perspectivas para llevar a cabo la investigación y el desarrollo de nuevos productos (Biocomercio sostenible, 2003).

La tendencia de los consumidores se inclina hacia los alimentos libres de productos de síntesis química (pesticidas, insecticidas, fungicidas, fertilizantes, entre otros) y aditivos químicos sintéticos (neutralizantes, preservantes, antioxidantes, colorantes y saborizantes), por lo que resulta interesante estudiar la actividad antioxidante de los aceites esenciales (AE) de plantas nativas para establecer su utilización potencial como aditivos naturales en los alimentos (Prior, 2003), con miras a mantener una adecuada alimentación y que influya en el mantenimiento de defensas antioxidantes (Zamora, 2007; Padilla *et al*, 2008).

Con base en lo expuesto anteriormente, se realizó el presente estudio que permitió evaluar la composición, la caracterización fisicoquímica y la capacidad antioxidante del AE obtenido de tres especies aromáticas: orégano (*Origanum vulgare*), orégano "Borde Blanco" (*Origanum vulgare ssp*) y Oreganito (*Lippia alba* Mill) cultivadas en la zona norte del departamento de Bolívar (Colombia). Los AE obtenidos se adicionaron a un aceite crudo de palma (*Elaeis guineensis*) con el fin de evaluar su capacidad antioxidante y determinar la estabilidad oxidativa. Los resultados indican que el AE de orégano "Borde Blanco" (*Origanum vulgare ssp*) presenta la mayor actividad y podría ser una alternativa interesante para sustituir los antioxidantes artificiales empleados comúnmente como aditivos de los aceites comestibles.

## 1. MARCO DE REFERENCIA

### 1.1 DEFINICIÓN Y COMPOSICIÓN DE ACEITES ESENCIALES

Los AE son mezclas complejas, normalmente líquidas o líquidos aceitosos, que presentan alta volatilidad y en general son los responsables del olor de algunas plantas (Bello, 1999); habitualmente, estas sustancias se evaporan al contacto con el aire por lo que también son conocidos como aceites volátiles (Thomas and Schumann, 1992). En general, los AE pueden ser definidos como líquidos aceitosos obtenidos a partir de diferentes partes de las plantas como flores, yemas, semillas, hojas, ramas, cortezas, madera, frutos y raíces (Burt, 2004; Ortuño, 2006).

Los AE están ampliamente distribuidos en unas 60 familias de plantas que incluyen: coníferas (pino, abeto), mirtáceas (eucaliptus), rutáceas (*Citrus spp*), umbelíferas (anís, hinojo), labiadas (menta) y compuestas (manzanilla), y pueden estar en diferentes órganos: raíz, rizomas (jengibre), madera (alcanfor), hoja (eucaliptus), fruto (anís) o flores (lavanda, tomillo, espliego) (Thomas y Schumann, 1992). En su gran mayoría los AE son de olor agradable, aunque existen algunos de olor relativamente irritante como por ejemplo los de la fracción aromática del ajo y la cebolla, los cuales contienen compuestos azufrados; por ser volátiles, deben ser almacenados en envases herméticos y en un lugar oscuro para prevenir cambios en su composición (Matiz *et al.*, 2012).

En la composición de los AE se pueden encontrar hidrocarburos alicíclicos y aromáticos, sus derivados oxigenados, sustancias azufradas y nitrogenadas (Wilkins, 1998), y se consideran una mezcla de componentes volátiles producidos por el metabolismo secundario de las plantas en cuya composición puede intervenir una porción de hidrocarburo polimetilénico de tipo terpeno con múltiplos de la fórmula  $(C_5H_8)_n$ , junto con otros compuestos casi siempre oxigenados pertenecientes a las familias de los alcoholes, ésteres, éteres, aldehídos y compuestos fenólicos funcionalizados, que son los responsables del olor que presentan algunas plantas (Staschenko *et al.*, 2010). En términos generales puede decirse que un metabolismo muy activo puede estar asociado con una mayor producción de AE (Madsen y Bertelsen, 1995).

La composición química de los AE puede verse afectada por la procedencia, el estado fitosanitario o de desarrollo de las plantas que los contienen (De Mastro, 1996), y por la influencia del medio ambiente (Chlodwig y Novack, 2001); también se consideran variables como la densidad del cultivo, el periodo estacional, la cantidad de agua de riego y luz artificial o natural en los cultivos de invernadero (Matiz *et al*, 2012); igualmente, son de mucha importancia las condiciones geográficas, botánicas y agrícolas del cultivo y los métodos de extracción y purificación empleados en su obtención (Granados *et al*, 2012).

## **1.2. CLASIFICACION DE LOS ACEITES ESENCIALES**

Los AE se clasifican con base en diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios. De acuerdo con su consistencia se clasifican en esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas. Las primeras son líquidos volátiles a temperatura ambiente, poseen consistencia menos fluida, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización, son ejemplos típicos el bálsamo de copaiba, bálsamo del Perú, Benjuí, bálsamo de Tolú y Estoraque, entre otros. Por su parte, las oleorresinas tienen el olor característico de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas; por ejemplo, caucho, gutapercha, chicle, balata y oleorresina de paprika, pimienta negra, clavo de olor, entre otros (Martínez, 2003).

De acuerdo a su origen los AE se clasifican como naturales, artificiales y sintéticos. Los naturales se obtienen directamente de la planta, no se someten a modificaciones físicas ni químicas posteriores y debido a su bajo rendimiento son costosos. Los artificiales se obtienen a través de procesos de enriquecimiento del AE con uno o varios de sus componentes; por ejemplo, la mezcla de esencias de rosas, geranio y jazmín enriquecida con linalool, o la esencia de anís enriquecida con anetol. Los aceites esenciales sintéticos, como su nombre lo indica, son obtenidos por la combinación de sus componentes, los cuales en la mayoría de las veces son producidos por procesos de síntesis química; además, al ser económicos son ampliamente utilizados en la industria de alimentos como aromatizantes y saborizantes, por ejemplo esencias de vainilla, limón y fresa (Martínez, 2003).

### 1.3 IMPORTANCIA DE LOS AE EN LA CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

El ser humano ha utilizado las plantas como fuentes de medicamentos naturales y actualmente se conoce que aproximadamente dos terceras partes de la población de los países en desarrollo las utilizan para el tratamiento de enfermedades (Fuentes, 1997; Roersch, 1994). Las plantas medicinales se caracterizan por poseer principios activos que pueden modificar el funcionamiento de los sistemas biológicos alterándolos o restableciendo el equilibrio funcional orgánico (Bandoni, 2002).

El valor económico de los AE y su aplicabilidad industrial están directamente relacionados con su composición química y con la actividad biológica particular que ellos posean (Stashenko *et al.*, 1996). En la actualidad, hay un interés creciente por la utilización de extractos naturales con características antioxidantes que pueden sustituir a los aditivos sintéticos en los alimentos, ya que esta es una alternativa prometedora para la prevención y el tratamiento de los trastornos y las enfermedades producidas por la presencia de impurezas y los residuos de reactivos presentes en muchos de los compuestos de síntesis (Arcila *et al.*, 2004).

Estudios realizados con diferentes especias han permitido aislar e identificar una amplia variedad de compuestos antioxidantes con estructura fenólica (como los tocoferoles), y otros como los carotenoides y el ácido ascórbico, que poseen la capacidad de proteger a las células contra el daño oxidativo, que provoca envejecimiento y la incidencia de enfermedades crónico-degenerativas, tales como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y la diabetes (Azuma *et al.* 1999). Los antioxidantes cumplen un papel preponderante en la preservación de la salud mediante la prevención de enfermedades ocasionadas por la oxidación de los lípidos, por lo tanto es importante minimizar la rancidez, retardar la formación de productos tóxicos y mantener su calidad nutritiva (Madhavi *et al.*, 1996, Kahkoren *et al.*, 1999).

Actualmente los antioxidantes de origen natural se utilizan en la industria farmacológica, cosmética y nutracéutica (Larson, 1997 y Risch & Chi-Tang Ho, 1997). Es importante reconocer que la concentración del antioxidante adicionado con el objetivo de incrementar la vida útil del producto puede afectar algunas características organolépticas, por lo que se debe profundizar en ésta área de

investigación con relación a conservar la calidad final (Guzmán, 2006; Burt, 2004; Sacchetti *et al.*, 2004). Los AE han sido estudiados desde el punto de vista de su sabor y fragancia en los alimentos saborizados, bebidas y otros productos (Frag *et al.* 1990); sin embargo, es importante considerar que algunos inducen el desarrollo de sabores no deseados, crean toxicidad y afectan severamente la durabilidad de muchos productos alimenticios (Frag *et al.*, 1990; Hiras y Takemasa, 1998), por lo que se requiere de investigación en procesos de desodorización (Moure *et al.*, 2001).

### **1.3.1 Producción mundial y local de AE**

Se conocen alrededor de 3000 tipos de AE a escala mundial, pero solo 300 tienen importancia comercial. El consumo del aceite de naranja ocupa el primer lugar, seguido del aceite de limón, el cual es utilizado en la industria de bebidas sin alcohol entre otras. En relación a su comercialización, el 33% de los AE se producen en países en desarrollo, tales como Argentina (aceite de limón), Brasil (aceite de naranja), China (aceite de eucalipto, citronela, geranio y pimienta), Egipto (aceite de jazmín), Haití (aceite de vetiver) e Indonesia (aceite de vetiver y citronela) (Biocomercio sostenible, 2003).

Colombia podría tener una producción importante de AE por su ubicación geográfica y por ser un país megabiodiverso; sin embargo, esta ventaja no ha contribuido al desarrollo de ésta área debido a las siguientes razones: a) son muy pocas las especies que poseen definiciones quimiotaxonómicas y estudios de fitomejoramiento; b) los programas de investigación especie a especie son muy escasos, existen muy pocos programas de investigación al respecto que garanticen la provisión de semillas mejoradas y certificadas, lo cual repercute en la homogeneidad en la composición de los AE obtengan c) se cuenta con muy pocos paquetes tecnológicos agronómicos y de post-cosecha que permitan estandarizar los procesos y productos obtenidos de las plantas aromáticas (Biocomercio sostenible, 2003).

### **1.3.2 Extracción de AE**

La extracción de los AE se puede realizar por métodos convencionales como la destilación con arrastre de vapor y el uso de solventes orgánicos; actualmente, ha adquirido gran importancia la

extracción con fluidos supercríticos utilizando dióxido de carbono como solvente (Simándi *et al.*, 1998; Yépez, 2001) debido a que este gas no es tóxico, ni explosivo; además, es fácil de remover y no deja residuos tóxicos en el AE, su uso facilita las diferentes operaciones de separación de los productos extraídos (Thomann *et al.*, 1993). No obstante, los principales métodos utilizados para obtener AE son los siguientes (Bandoni 2002; Ortuño, 2006): destilación con agua o hidrodestilación (HD), destilación por arrastre con vapor de agua, destilación con agua y vapor (cohobación), destilación sometida a una degradación térmica, destilación-extracción con solvente (DES), head-space (HS), y destilación asistida por radiación microondas (HDM).

### **1.3.2.1 Extracción por hidrodestilación**

En esta metodología el vapor de agua penetra los tejidos de la planta y extrae el AE presente en las estructuras contenedoras y lo difunde a través de las membranas de las células, el AE removido se vaporiza inmediatamente desde la superficie, siguiendo los principios de la ley de Raoult (ley de las presiones parciales de los gases). Este proceso continúa hasta que se remueve todo el aceite contenido en las glándulas de la planta. En términos generales los constituyentes oxigenados del aceite son más solubles en el agua hirviendo (unas 100 veces más) que los hidrocarburos análogos. Por esta razón, en las etapas iniciales, los componentes se liberan de acuerdo con su grado de solubilidad, antes que por sus puntos de ebullición (Granados *et al.*, 2012).

A medida que avanza la destilación los compuestos se liberan en función de su temperatura de ebullición; y por lo general, la última fracción es rica en sesquiterpenos y sus análogos oxigenados menos volátiles (Clarke, 2008). Otro factor que juega un papel importante durante la extracción con esta técnica es el contenido de compuestos grasos (lípidos) en la planta, ya que son poco volátiles y en cierto modo retienen por solubilidad a la fracción de hidrocarburos volátiles (Sánchez, 2006; Sarker *et al.* 2006).

### **1.3.2.2 Extracción mediante hidrodestilación asistida por la radiación con microondas (HDM).**

El método consiste en sumergir el material vegetal en agua y someterlo a la acción de la radiación de microondas; el agua se calienta hasta su punto de ebullición y libera los compuestos del AE contenidos en las glándulas por efecto de la presión de vapor; los compuestos volátiles en fase gaseosa son arrastrados hasta el intercambiador de calor formando dos capas, una rica en aceite y

otra denominada hidrolato donde predomina el agua; las dos fases obtenidas pueden ser separadas por decantación. El periodo de destilación por HDM toma de 10 a 30 min. Se debe tener en cuenta que el tiempo de hidrodestilación influye tanto sobre la cantidad de aceite aislado como en su composición y calidad (Stashenko *et al.* 2010). El método de extracción asistida por la radiación de microondas, presenta ventajas sobresalientes con respecto a las técnicas tradicionales de destilación: es un proceso muy rápido y relativamente económico, los AE obtenidos se encuentran libres de los productos de descomposición térmica y de contaminantes (Ferhat, *et al.* 2006).

## **1.4 CONTROL DE CALIDAD DE LOS ACEITES ESENCIALES**

Existen diferentes métodos para el control de la calidad de los AE, entre los cuales se encuentran los métodos fisicoquímicos que permiten determinar propiedades macroscópicas de la mezcla como son su densidad, solubilidad en etanol, índice de refracción, entre otras.

**1.4.1 Índice de refracción.** El índice de refracción de una sustancia transparente, mide la relación entre la velocidad de la luz en el vacío y la velocidad de la luz en el interior de la sustancia. Se usa para la identificación y determinación de la pureza de un compuesto y para el análisis de la composición de mezclas binarias homogéneas de constituyentes conocidos. Esta propiedad sirve para controlar la pureza y la calidad debido a que cada tipo de AE posee un índice de refracción característico (Bandoni, 2000) la norma ISO 280:1998 exige su medición.

**1.4.2 Solubilidad.** Los aceites se disuelven bien en solventes orgánicos tales como benceno, pentano, éter de petróleo, *etc.* En cambio, se obtienen grandes diferencias de solubilidad en alcohol al 70 – 90% (Bandoni, 2000). Si bien los AE son solubles en medio no polar, también suelen tener una solubilidad alta en etanol, lo que es ampliamente explotado en la elaboración de fragancias (Pomilio, *et al.* 1985). La norma internacional que rige esta determinación es la ISO 875:1999.

**1.4.3 Densidad.** La determinación de la densidad permite algunas veces deducir acerca de la composición de los aceites. Los AE que tienen densidades mayores de 1,0 g/cm<sup>3</sup> contienen principalmente fenoles o sus derivados y ésteres; los de densidad más baja son ricos en hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpénicos (Bandoni, 2000). La densidad se mide de acuerdo con la norma ISO 279:1998.

Los parámetros analíticos utilizados en el control de calidad de los AE, se describen en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.** Parámetros analíticos utilizados en el control de calidad de los AE.

<b>Características</b>	<b>Determinación</b>
Organolépticas	Olor, Apariencia y Color
Determinaciones físicas y químicas	Densidad Rotación óptica Índice de refracción Miscibilidad en etanol Punto de congelación Punto de inflamación Rango de destilación Índice de acidez Índice de éster Índice de saponificación Índice de acetilo Índice de fenoles
Características cromatográficas	Perfil cromatográfico por CG Cuantificación principales componentes
Espectroscópicas	Ultravioleta – visible- Infrarrojo
Otras determinaciones	Pesticidas - Metales pesados

Fuente: Bandoni, 2002.

#### **1.4.5 ANÁLISIS QUIMICO DE LOS ACEITES ESENCIALES**

Para la producción y comercialización de un AE se deben considerar los siguientes parámetros: el estudio de factibilidad de su producción, la aplicación específica que se le quiere dar y la determinación de las características fisicoquímicas y organolépticas, todas ellas son necesarias para establecer las normas de calidad que debe cumplir en el mercado mundial. Para satisfacer estas normas es necesario estudiar las variables que afectan su composición como son: el método de cultivo, condiciones geobotánicas, métodos de extracción, época de recolección, partes de la planta que se utilizaron, métodos de almacenamiento, manejo de material vegetal, edad y actividad biológica. Estos aspectos de composición y parámetros de calidad se obtienen a través de diferentes métodos de separación, identificación y cuantificación. (Bandoni, 2000; Jirovetz, 2006, Guenter, 1995; Ray, 2002). El método de análisis de los AE que posee mayor aplicación a nivel mundial está



fundamentado en la cromatografía de gases en columna capilar usando detectores convencionales, como el de ionización en llama (FID) y selectivo de masas (MSD) (Bandoni, 2000, Stashenko, 1998).

#### 1.4.5.1 Cromatografía de gases

La cromatografía de gases (CG) es una técnica de separación, fundamentada principalmente en fenómenos de repartición del analito entre dos fases; una móvil, constituida por un gas preferiblemente inerte (helio, argón, hidrógeno, nitrógeno); y otra estacionaria, constituida por un sólido o líquido soportado sobre las paredes de la columna. El cromatógrafo consta de un sistema de inyección que permite introducir la muestra en la columna y un sistema de detección de las diferentes sustancias a medida que éstas van saliendo de la columna. La columna se coloca en un horno con temperatura regulable y programable, lo que permite influir de forma decisiva sobre la separación de los componentes de la mezcla (Baharum *et al.*, 2010; Granados *et al.*, 2012; Matiz *et al.*, 2012).

Las columnas más utilizadas actualmente son de tipo capilar y están constituidas por un tubo de sílice fundido de 0,25 mm de diámetro y 25 a 60 m de largo; estas columnas proporcionan una alta resolución y permiten separar los componentes de las mezclas que componen el analito por su polaridad y peso molecular. En el análisis de los AE son muy utilizadas las que contienen como fase estacionaria polietilenglicol (CARBOWAX 20m), que es una fase polar; y poli(dimetilsiloxano) (DB-1, HP-1, DB-5) que es una fase no polar (Baharum *et al.*, 2010). La parte más importante del sistema cromatográfico es la columna, y su elección está regida por la naturaleza de las muestras que se pretenden analizar. En la elección siempre se debe considerar que La polaridad de la fase estacionaria, el diámetro y la longitud de la columna influyen directamente sobre la eficiencia de la separación y el tiempo requerido para realizar el análisis (Stashenko *et al.*, 2010).

En los análisis de los componentes de un AE mediante cromatografía gaseosa se utiliza como parámetro de medición la comparación de los tiempos de retención ( $t_r$ ) de cada uno de los analitos, o tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la aparición del pico cromatográfico, con los  $t_r$  de los compuestos utilizados como patrones o estándares de referencia. Los tiempos de retención

dependen de la técnica de inyección, las variaciones de temperatura, el flujo de los gases de arrastre, el tipo de columna seleccionado y el diseño del equipo (Stashenko *et al.*, 2010).

Los índices de retención proporcionan información respecto a la identidad de los componentes, pero ésta no puede basarse exclusivamente en ellos, ya que muchas moléculas poseen índices de retención similares. Por esto es necesario aplicar otra técnica que brinde más información estructural como la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG-EM) (Stashenko *et al.*, 2010).

#### **1.4.5.2 Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (CG-EM)**

Es una herramienta analítica muy eficiente para el estudio de la composición de los AE, y muy adecuada para la identificación de cada uno de sus componentes. La inyección de la muestra puede hacerse directamente al cromatógrafo, sin ningún tratamiento previo, debido a que los componentes de los AE son regularmente de bajo peso molecular y relativamente volátiles; este es un aspecto importante ya que se eliminan en gran medida las posibles modificaciones en la composición y/o la estructura de los constituyentes. En el cromatógrafo, los componentes de la muestra se separan y pasan al espectrómetro de masas, permitiendo registrar el espectro de cada una de las sustancias presentes en el AE. De esta forma los constituyentes de la muestra se pueden identificar mediante los patrones de fragmentación que se observan en sus espectros de masas (Masada, 1997; Bauer, *et al.*, 2001; Lawrence, 2003)

##### **1.4.5.2.1. Espectrometría de Masas (EM)**

La espectrometría de masas comprende el estudio de los fragmentos ionizados (iones-radical), provenientes de la ionización de compuestos puros, generados en la cámara de ionización del equipo de EM. Los iones obtenidos se aceleran mediante campos eléctricos y son enviados hacia el analizador de masas, donde son discriminados de acuerdo a la relación masa/carga ( $m/z$ ) que cada uno posee y se registran de acuerdo con su abundancia o corriente iónica parcial. Este registro se conoce como espectro de masas (EM) y es característico para cada compuesto en particular (Grob, 1995; Masada, 1997; Lawrence, 2003). El equipo de masas está conformado por un sistema de alto

vacío, una cámara de ionización, un analizador de masas o separador de iones, y un detector acoplado a un sistema de amplificación y registro, las señales se obtienen en forma de una gráfica, denominada (EM) (Grob, 1995; Masada, 1997; Lawrence, 2003).

Para la obtención de los iones-radical, se utiliza frecuentemente la ionización electrónica (IE). En esta técnica, se emplea con regularidad un haz de electrones con una energía cercana a 70 eV, producidos por emisión termoiónica desde un filamento de tungsteno. El haz de electrones interactúa con las moléculas que llegan a la cámara de ionización, y la energía transmitida por el haz de electrones produce la ionización y subsiguiente fragmentación de las moléculas de la muestra (Grob, 1995; Lawrence, 2003).

La identificación de los componentes del AE se realiza a través de comparación de los índices de retención de las sustancias patrón, obtenidos en dos fases estacionarias, polar y apolar, con los índices de Kováts experimentales calculados para los componentes del AE (Bauer, 2001, Shibamoto, 1981, Ray, 2002), y mediante los diferentes patrones de fragmentación que se observan en sus espectros de masas (Masada, 1997; Satinder, 2003; Kitson, *et al*, 1996, Lawrence, 2003).

## **1.6 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

Durante los últimos años, se ha estudiado la influencia que tienen los radicales libres (RL) como promotores de un gran número de enfermedades (Gutteride, *et al*, 1994; Young and Woodside, 2001) y del deterioro de los alimentos grasos. La oxidación de los componentes lipídicos de un alimento (regularmente ácidos grasos y triglicéridos) es conocida como rancidez oxidativa o peroxidación lipídica; es una de las reacciones que deterioran y afectan de forma importante la calidad de varios alimentos. La rancidez oxidativa es iniciada por RL del oxígeno o por el ataque del oxígeno molecular a los RL preformados en los ácidos grasos poliinsaturados que forman parte de las grasas y aceites (Stashenko *et al.*, 2010).

La peroxidación lipídica iniciada por los RL causa muchos daños a nivel biológico, entre los cuales se destacan la aterosclerosis (Iwakami, 1965), enfermedades del hígado (Suematsu, *et al*, 1982), diabetes (Saito, 1979), y envejecimiento (Sagai, 1980). Los peróxidos lipídicos y sus productos secundarios conocidos como “compuestos carbonílicos reactivos”, también causan daños biológicos

significativos, entre ellos se destacan los aldehídos como el formaldehído, acetaldehído, malonaldehído (MA) y el 4- hidroxinonenal, debido a que son reconocidos como mutagénicos y carcinogénicos (Chaudhary, *et al*, 1994; Esterbauer, *et al*, 1991; Marnett, *et al*, 1985).

La peroxidación puede ser prevenida o retrasada por los antioxidantes, los cuales son sustancias orgánicas de origen sintético o natural que actúan como atrapadores de los RL del oxígeno involucrado en la oxidación de los ácidos grasos (Gutteridge and Halliwell, 1994; Percival, 1998). Los antioxidantes sintéticos son los más utilizados; entre ellos, se destacan el hidroxibutilanisol (BHA o aditivo alimentario E-320), que es una mezcla de los isómeros 2-*tert*-butil-4-hidroxianisol y 3-*tert*-butil-4-hidroxianisol, el butirato de hidrotolueno (BHT o aditivo alimentario E-321) y la *ter*-butilhidroquinona (TBHQ o aditivo alimentario E-319) (Namiki, 1990; Sherwin, 1976; Pokorny, *et al*, 2001); sin embargo, existe mucha preocupación respecto a sus efectos nocivos para la salud tanto humana como animal, debido a su potencial acción carcinogénica y a problemas relacionados con toxicidad (Namiki, 1990; Valenzuela and Nieto, 1996; Ford, *et al*, 1980). Esta situación ha estimulado la investigación sobre sustancias de origen natural que posean actividad antioxidante potencial (Valenzuela and Nieto, 1996).

Dentro de los antioxidantes de origen natural más estudiados, se encuentran: derivados de ácidos fenólicos, flavonoides, terpenos, tocoferoles, fosfolípidos y ácidos orgánicos polifuncionales (Dugan, 1980; Wanasundara, *et al*, 1994). De igual forma, se ha estudiado la importancia del consumo de frutas y vegetales, y su influencia en la disminución de las enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares y cáncer, debido a que estos productos agrícolas poseen antioxidantes, especialmente vitaminas, como el ácido ascórbico (Vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (Vitamina E) y el  $\beta$ -caroteno (Ames, *et al*, 1990; Percival, 1998; Valenzuela and Nieto, 1996; Valgimigli, *et al*, 1999; Willett, 1994).

El interés por los antioxidantes naturales también ha llevado a evaluar las propiedades de algunos AE (Zygadlo, *et al*, 1995; Six, 1994) y extractos vegetales (Atoui, *et al*, 2005; Cao, *et al*, 1996). De forma muy general se ha observado en estos materiales que la mayor actividad antioxidante se encuentra en fracciones que contienen tocoferoles (Jung and Min, 1990; Bruun-Jensen, *et al*, 1994),

carotenoides (Jung and Min, 1991) y otros compuestos fenólicos diferentes a los tocoferoles (Budowski, 1964; Wu, *et al.*, 1994).

### **1.6.1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

En la actualidad se han desarrollado un gran número de métodos para evaluar la capacidad antioxidante total de alimentos, suplementos dietarios, extractos vegetales o compuestos puros. Sin embargo, pocos de ellos se utilizan con regularidad debido a limitaciones relacionadas con los requerimientos metodológicos y la selección de las fuentes de radicales libres (Prior, *et al.*, 2005; Schauss, *et al.*, 2006). Las evaluaciones fundamentadas en el uso de radicales como el DPPH y ABTS<sup>•+</sup> son considerados por la comunidad científica como los métodos espectrofotométricos más comunes utilizados para la determinación de la capacidad antioxidante de alimentos, bebidas y extractos vegetales (Bendini, *et al.*, 2006), debido a que los procedimientos requeridos en estas metodologías son simples, rápidos, sensibles y reproducibles (Ozcelik, *et al.*, 2003). Los antioxidantes pueden desactivar los radicales por dos mecanismos principalmente: transferencia de átomos de hidrógeno y transferencia de electrones. Los resultados finales son los mismos independientemente del mecanismo, pero la energía cinética y potencial de las reacciones difieren (Prior, *et al.*, 2005; Antolovich, *et al.*, 2002; Moon y Shibamoto, 2009).

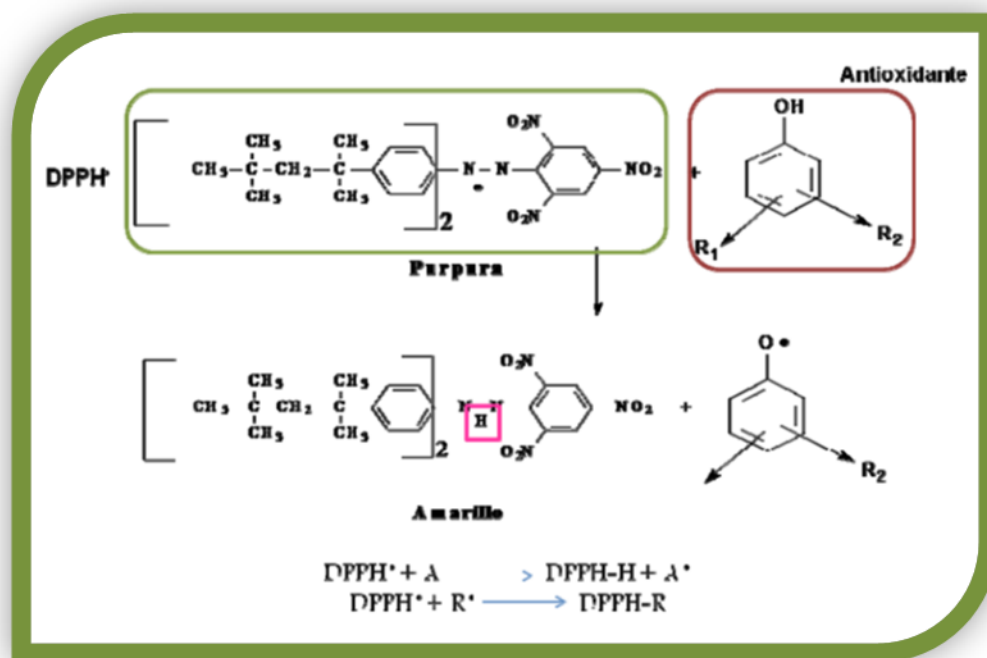
#### **1.6.1.1 Métodos que miden la capacidad para secuestrar radicales**

Existen algunos métodos que miden la capacidad para secuestrar los radicales formados en los procesos de peroxidación lipídica. Uno de ellos consiste en medir la concentración de antioxidante requerido para secuestrar el 50% de los radicales en un tiempo determinado. Los radicales comúnmente utilizados son el 2,2-difenil-1- picrilhidracilo (**DPPH<sup>•</sup>**) y ácido 2,2'-azino-bis-(3-etiltiazolinabencenosulfónico- 6) (**ABTS<sup>•+</sup>**).

#### **1.6.1.2. DPPH (Ensayo actividad antiradicalaria)**

Es un ensayo sencillo y muy sensible; el radical DPPH es un radical de nitrógeno orgánico disponible comercialmente (Brand, *et al.*, 1995). El efecto antioxidante es proporcional a la desaparición del

radical DPPH en las muestras que se están analizando. El monitoreo del radical DPPH se realiza con un espectrófotometro UV y se ha convertido en un método muy utilizado, el  $\lambda$  máximo de absorción se presenta a 515 nm (Moon y Shibamoto, 2009). En la reacción, la coloración del DPPH cambia de púrpura a amarillo debido a la absorción de un átomo de hidrógeno desde el antioxidante (Figura 1). Esta reacción es estequiométrica con respecto al número de átomos de hidrógeno absorbidos y la actividad antioxidante de la muestra se expresa en términos de micromoles ( $\mu\text{mol}$ ) equivalentes de Trolox por cada 100 g de muestra (TE/100 g). Los resultados se reportan como  $\text{IC}_{50}$ , refiriéndose a la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración inicial del radical DPPH hasta un 50% (Moon y Shibamoto, 2009). El efecto antioxidante también puede ser evaluado usando resonancia paramagnética electrónica (RPE); en esta técnica se realiza un "conteo" de los radicales presentes en la mezcla del DPPH con una muestra cualquiera que se quiera estudiar. La disminución de los radicales DPPH en el tiempo es una medida del efecto antioxidante. En esta metodología los resultados son presentados en términos de "equivalentes de Trolox" (Huang et al., 2005).



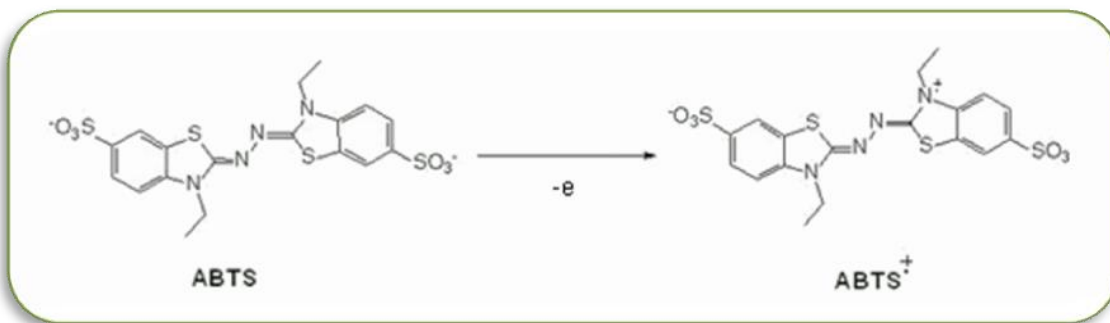
**Figura 1.** Reacción de transferencia de electrones del compuesto polifenólico (A) sobre el radical DPPH. (Moon y Shibamoto, 2009).

### 1.6.1.2.1 Cation-radical ABTS<sup>•+</sup>

El efecto protector de los AE y de las sustancias de referencia se determina, entre otros, por el método descrito por Re R. *et al.* (1999), el cual se fundamenta en la capacidad que tienen algunos compuestos para atrapar radicales, *i.e.* ABTS<sup>•+</sup>. La técnica se usa ampliamente para muestras biológicas, alimentos, compuestos puros o extractos de plantas de naturaleza hidrófila o lipofílica (Kuskoski, *et al.*, 2005; Re *et al.* 1999).

El ABTS<sup>•+</sup> es un cromógeno artificial que presenta un espectro ultravioleta (UV) con tres máximos de absorbancia a 414, 752 y 842 nm en medio acuoso, y a 414, 713, 873 nm en medio etanólico (Re, *et al.*, 1999; Nenadis, *et al.*, 2004; Branchi, *et al.*, 2005). La reducción del cation-radical depende de la concentración del antioxidante y del tiempo de reacción. El grado de decoloración permite conocer el porcentaje de inhibición del cation radical ABTS<sup>•+</sup> en función de la concentración y el tiempo, y es calculado con respecto a la concentración del Trolox®, utilizado como estándar bajo las mismas condiciones (Nenadis, *et al.*, 2004; Branchi, *et al.*, 2005).

Ambos radicales (DPPH y ABTS<sup>•+</sup>), generalmente presentan excelente estabilidad bajo las condiciones de las evaluaciones y exhiben importantes diferencias en sus respuestas frente a las concentraciones de varios antioxidantes El cation radical nitrogenado es generado por la oxidación del ABTS con persulfato de potasio, (Re *et al.*, 1999; Nenadis, *et al.*, 2004), como se aprecia en la Figura 2.

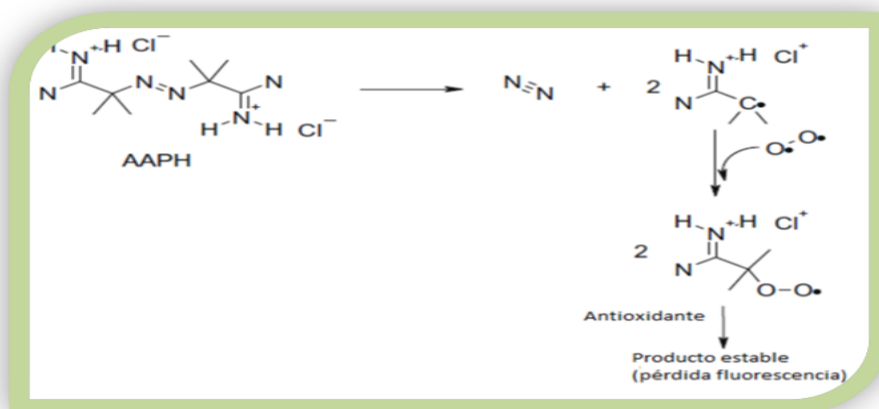


**Figura 2.** Generación del cation-radical ABTS<sup>•+</sup>. (Re R. *et al.* 1999; Nenadis, *et al.*, 2004).

### 1.6.1.2.2 ORAC (Capacidad de absorbanza del radical oxígeno)

Este método permite medir la inhibición del antioxidante causada por el radical piróxilo que induce oxidaciones; por lo tanto, a medida que la molécula fluorescente (fluoresceína) es atacada y dañada por los radicales, se va perdiendo su fluorescencia. La función de los antioxidantes es la de proteger las moléculas que tienen tendencia a oxidarse, y cuanto más capacidad antioxidante tiene un compuesto o alimento mayor es la capacidad de mantener la emisión de luz por parte de la molécula fluorescente. El grado de protección frente a la oxidación se cuantifica con un medidor de fluorescencia y se reporta en términos de "equivalentes de Trolox" (TE) (Ou, et al., 2002; Huang et al., 2005).

En el análisis se utiliza la proteína  $\beta$ -ficoeritrina fluorescente como un sustrato oxidable y AAPH (2 azobis (2 amidino-propano) dihidrocloruro) como generador de radicales peróxilo o radicales hidroxilo (Figura 3). Si se emplea el cobre como generador de radicales no se puede utilizar el Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) como estándar de referencia debido a que este puede interactuar como un pro-oxidante con el cobre. En la cuantificación de la respuesta se utiliza la técnica de medición del área bajo la curva de descenso de la actividad antioxidante (AUC). Por lo tanto, en la medición se combina tanto el porcentaje de inhibición como el periodo de inhibición a lo largo del tiempo producido por los antioxidantes en estudio. Esta evaluación se puede adaptar para medir la capacidad antioxidante de materiales tanto lipofílicos como hidrofílicos (Prior et al., 2005; Zuleta et al., 2009).



**Figura 3.** Reacción del radical AAPH durante el ensayo ORAC. (Prior et al., 2005; Zuleta et al., 2009)



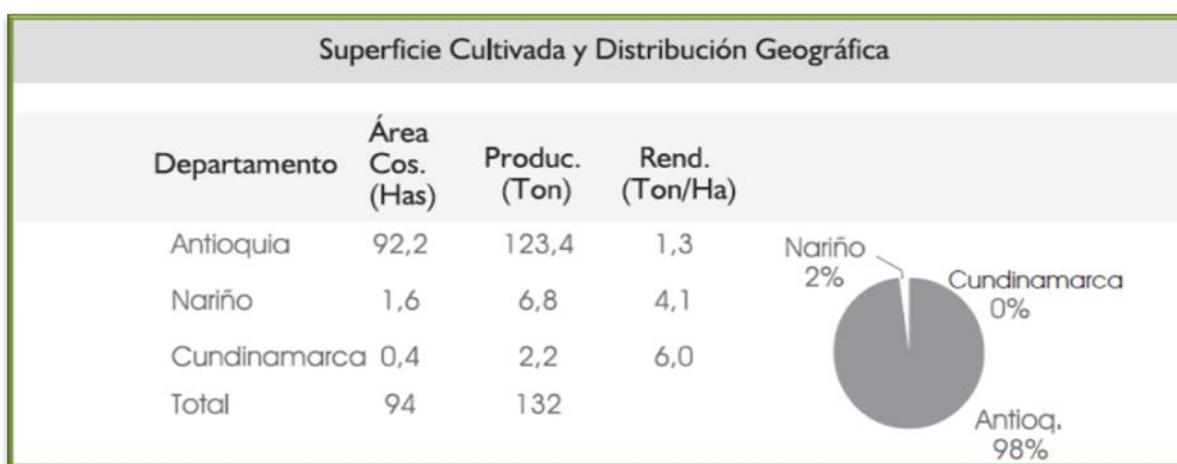
## 1.7 GENERALIDADES DEL OREGANO (*Origanum vulgare*)

El orégano es un vegetal herbáceo, que forma un pequeño arbusto y crece hasta 80 cm, perteneciente a la familia lamiaceae (labiatae), conocidas también como labiadas. Los tallos son erectos, filosos y aromáticos; las hojas ovales, pecioladas, dentadas o enteras; las flores pueden ser rosadas, violáceas o blancas de hasta 7 mm, reunidas en inflorescencias redondeadas terminales y los estambres son sobresalientes (<http://www.herbotecnia.com.ar/exotica-oregano.html>; consultado Septiembre 28 de 2012). Con base en criterios morfológicos el género *Origanum* se ha clasificado en 3 grupos, 10 secciones, 38 especies, 6 subespecies y 17 híbridos (Skuola, 1999).

En Colombia, esta planta se puede encontrar como cultivo principalmente en los departamentos de Antioquia, Cundinamarca y Nariño: En la Tabla 2 se compila alguna información relacionada con la superficie cultivada y la distribución geográfica del orégano en Colombia.

**Tabla 2. Superficie Cultivada y Distribución Geográfica del Cultivo de Orégano en Colombia.**

Tomado de: <http://cadenahortofruticola.org>.



El rendimiento y la calidad de los AE del orégano son muy dependientes de las condiciones de temperatura, altitud, pH, humedad relativa y clima del suelo. En la Figura 4 se compila alguna información relacionada con los requerimientos del cultivo del orégano.

Temperatura Óptima	18-24 °C
Humedad Relativa	70%
PH	Tolera el PH Alcalino.
Altitud	1500 a 3000 msnm
Clima Suelo	Tiene éxito en casi todos los tipos de suelo ricos en materia orgánica y con buen drenaje, de preferencia no salinos; en los suelos arcillosos la longevidad se reduce. Los mayores rendimientos en aceite esencial se obtienen en zonas bien soleadas y cuya altitud no sea excesiva. Crece espontáneamente donde el clima sea entre templado y subtropical, no demasiado seco. Resiste bien las heladas, sobre todo el orégano rojo (la spp. vulgare) y ambos mucho más resistentes que el O. majorana. (Infoagro)

**Figura 4. Condiciones óptimas para el cultivo del Orégano.** Tomado de: <http://cadenahortofruticola.org>).

El consumo de orégano en Colombia es aproximadamente de 11 toneladas al año; y en el mercado internacional algunos países como Perú, Ecuador, Venezuela y Estados Unidos, desde el año 2000, comenzaron a ser tanto exportadores como consumidores. ([http://cadenahortofruticola.org/admin/bibli/310cap\\_7oregano.pdf](http://cadenahortofruticola.org/admin/bibli/310cap_7oregano.pdf); septiembre 30 de 2012).

Como se mencionó anteriormente, la composición y la calidad de los metabolitos secundarios de estas plantas dependen de los factores climáticos, la altitud, la época de cosecha, y su estado de crecimiento (Tabla 3). Por lo anterior, el estudio de estos factores y su influencia en el cultivo son de gran importancia para lograr un mejor aprovechamiento y explotación (Kokkini, 1997 y Arcila, *et al.*, 2004).

**Tabla 3. Características de varios tipos de orégano.**

Nombre Científico	Nombre Común	Hojas	Altura(cm)	Suelo	Luz solar	Color de las flores
<i>Origanum syriacum</i> <i>Origanum maru</i>	Orégano Sirio	Perennial	30,48 60,96	Bien drenado	Sol	Blanco
<i>Origanum onites</i>	Orégano de Creta	Perennial	5,080		Sol	Blanco
<i>Origanum dictamnus</i>	Dittany de Creta	Tender perennial	30,48 38,10	Bien drenado	Sol	Rosado
<i>Origanum vulgare aureum</i>	Mejorama dorada trepadora	Perennial	7,620 20,32	Bien drenado	Sol	Blanco
<i>Origanum vulgare hirtum</i>	Orégano Griego	Perennial	30,48 45,72	Bien drenado	Sol	Blanco
<i>Origanum laevigatum</i> "Herrensausen"	Orégano Herrenhausen	Perennial	5,080	Bien drenado	Sol	Púrpura
<i>Origanum laevigatum</i> "Hopleys"	Orégano Púrpura	Perennial	30,48 38,10	Bien drenado	Sol	Púrpura
<i>Origanum majoricum</i>	Orégano Italiano	Perennial	30,48 38,10	Húmedo, bien drenado	Sol y sombra	Blanco
<i>Origanum kaliteri</i>	Orégano Kaliteri	Tender perennial	30,48 60,96	Bien drenado	Sol	Blanco
<i>Origanum rotundifolium</i> cv	Orégano hermoso		38,10	Seco a húmedo	Sol	Rosado
<i>Lippia graveolens</i>	Orégano Mexicano	Tender perennial	5,080 7,620	Bien drenado	Sol	Blanco
<i>Origanum majorana</i>	Orégano Siciliano o mejorama dulce	Tender perennial	20,32 25,40	Húmedo, bien drenado	Sol	Blanco

Fuente: Kokkini, 1997

### 1.7.1 Composición química de los aceites esenciales del orégano

Muchas especies de orégano poseen abundantes AE y en ellos predominan los monoterpenos, los cuales son considerados como los responsables de las fragancias y las sensaciones de olor y sabor que presentan estas plantas. Los monoterpenos se clasifican aproximadamente en 35 grupos que son estructural y biológicamente muy diferentes. En algunas especies se encuentran cantidades significativas de timol y/o el carvacrol, los cuales son compuestos fenólicos naturales considerados como antioxidantes, agentes antifúngicos, antibacteriales, acaricidas, analgésicos, antiacné,

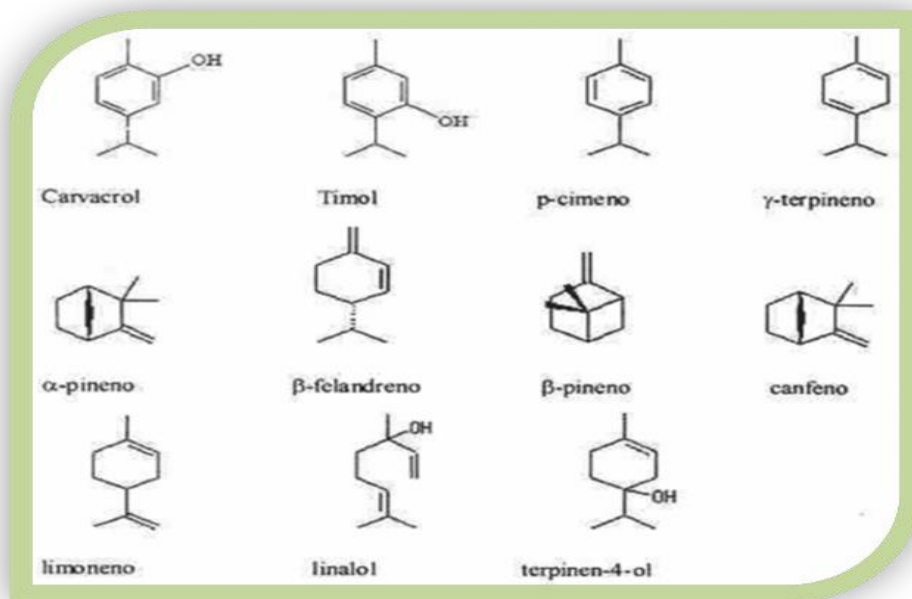
antiespasmódicos, desodorantes, dermatigénicos, expectorantes, insecticidas, larvicidas, pesticidas y vermícidas. Estos compuestos se encuentran presentes en cantidades significativas en los AE obtenidos de algunas especies de los géneros *Thymus*, *Origanum*, *Satureja*, *Thymbra* y *Lippia* (Duke, 2002).

Los principales quimiotipos de la especie *O. vulgare* contienen en sus AE carvacrol y timol originados por enzimas específicas que dirigen su biosíntesis. Así por ejemplo, se encontró que los compuestos químicos presentes en mayor concentración en el aceite esencial del orégano mexicano (*Lippia berlanderi Schauer*) son el timol y el carvacrol. (Arcila, *et al.*, 2004).

Otras especies como el *Orégano vulgare* subsp. *hirtum* (conocidas comercialmente como orégano griego) tienen altos contenidos de fenoles en sus AE, encontrándose que el carvacrol y el timol representan el 78.27% de su contenido. Otros componentes presentes son los monoterpenos hidrocarbonados,  $\gamma$ -terpineno y p-cimeno con un 5,54 y 7,35% del total del aceite, respectivamente (Granados *et al.*, 2012).

La subespecie *O. vulgare* sp. *hirtum* es la más estudiada, especialmente con relación a la composición y calidad de su AE, y por su importancia comercial. Se han encontrado rendimientos de AE en la hoja seca entre 2 y 6%, porcentajes altos que se ven afectados por la altitud y la época de recolección, siendo muy bajo en el otoño (Granados, *et al.*, 2012). Los compuestos mayoritarios encontrados en *O. vulgare* sp. *hirtum* son el carvacrol, timol, p-cimeno y  $\gamma$ -terpineno; sin embargo, en diversos estudios realizados por cromatografía de gases/espectrometría de masas se han identificado de 16 a 56 compuestos diferentes. (Martínez, 2003). Estos componentes también se han encontrado en *O. dictamnus* y se sabe que otras especies como *O. scabrum* y *O. microphyllum* contienen respectivamente alrededor de 28 y 41 compuestos diferentes. En el AE del orégano que crece en forma silvestre se ha encontrado la presencia dominante de carvacrol y timol. Se ha observado en otros estudios que un incremento en los porcentajes de timol provoca una disminución en el contenido de carvacrol. De igual manera, los hidrocarburos monoterpenoides  $\gamma$ -terpineno y p-cimeno están presentes de manera constante en los aceites esenciales, pero siempre en cantidades menores a las de los dos fenoles. (Arcila, *et al.*, 2004).

En el aceite del orégano silvestre cultivado en hidroponía y adicionado de fósforo, se han identificado 46 componentes, entre ellos carvacrol y el p-cimeno. Al mismo tiempo, se observó un incremento en el porcentaje de p-cimeno y una disminución en carvacrol cuando se comparó con el aceite de plantas enriquecidas con nitrógeno (Martínez, 2003).



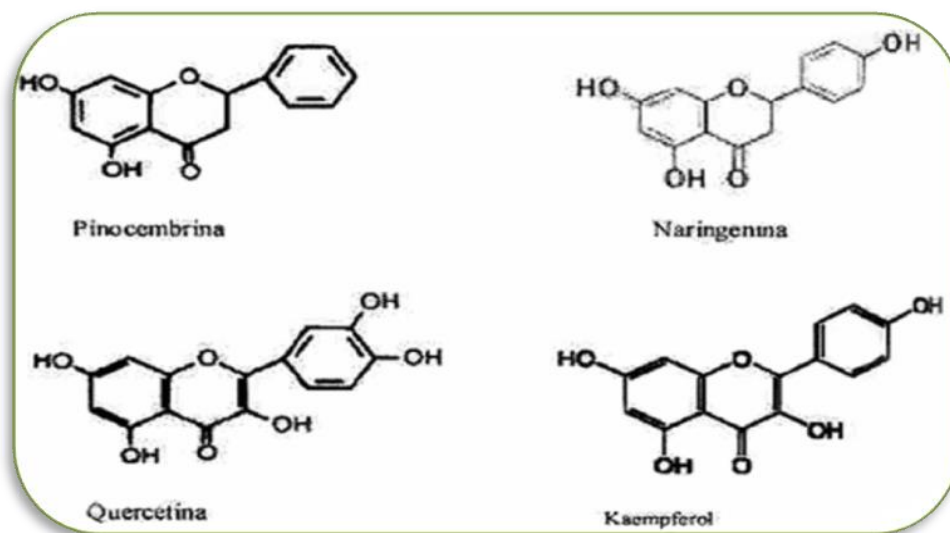
**Figura 5.** Algunos compuestos presentes en los aceites esenciales de orégano (Arcila et al., 2004).

Los AE de las especies de *Lippia* contienen limoneno, β-cariofileno, p-cimeno, canfor, linalol, α-pineno y timol, los cuáles pueden variar de acuerdo al quimiotipo (Figura 5) (Arcila et al., 2004).

Una característica sobresaliente del género *Lippia* es la diferencia que se observa en la composición del AE reportado para la misma especie proveniente de diferentes orígenes geográficos. Sin embargo, vale la pena señalar que los aceites obtenidos de la misma especie cultivada en una eco-región específica, mantienen constante su composición durante el tiempo (Soler, et al., 1986; Souto, et al., 1996 y 1997), y se ha encontrado que en el género *Lippia* la especie *dulcis* biosintetiza mono y sesquiterpenoides lo cual es indicio de diversidad genética. En consecuencia, la cría y selección de cultivares de especies silvestres potencialmente productoras de aceites valiosos parece ser un área de investigación prometedora. Por otro lado, la literatura sobre los componentes no volátiles de

*Lippia* es escasa y fragmentada, predominando los flavonoides de tipo flavona. Los estudios comparativos sobre el patrón de flavonoides puede ser útil para establecer relaciones a nivel de subgéneros en diferentes especies (Kintzios, 2002).

Es evidente que la química de las especies de *Lippia* ha sido en gran parte dedicada al estudio de los AE. Sin embargo, se puede anticipar que las investigaciones sobre iridoides, que son considerados los marcadores quimiotaxonómicos de las Verbenaceae, igualmente requieren de otros estudios sobre los metabolitos secundarios no volátiles como las naftoquinonas, los cuales serán necesarios para aclarar algunos interrogantes quimiotaxonómicos de este género que es muy complejo (Kintzios, 2002). En los extractos metanólicos obtenidos de hojas de *L. graveolens* se han encontrado los iridoides: loganina, secologanina, secoxiloganina, dimetilsecologanosido, ácido logánico, ácido 8-epi-logánico, carioptosido; los flavonoides naringenina, pinocembrina, lapachenol e icterogenina, entre otros compuestos (Martínez, 2003). En la Figura 6, se presentan las estructuras químicas de algunos de los compuestos encontrados en el orégano (Martínez, 2003; Arcila *et al.*, 2004).



**Figura 6.** Flavonoides usuales presentes en las plantas de orégano. . (Martínez, 2003; Arcila *et al.*, 2004).

### **1.7.2 Actividad biológica de los componentes del orégano**

Dentro de las actividades biológicas del orégano (género *Origanum* y *Lippia*) se encuentran la actividad antimicrobiana, antiparasitaria, estrogénica, antígenotóxica, insecticida y antioxidante. La principal es su capacidad antioxidante, encontrada especialmente en especies del género *Origanum*. La función antioxidante que pueden cumplir diversos compuestos en los alimentos ha atraído mucha atención en relación con el papel que pueden desempeñar en la prevención de las enfermedades cuando se adicionan a la dieta alimenticia (Kahkonen *et al.*, 1999). En algunos estudios realizados sobre especias se han aislado una amplia variedad de compuestos fenólicos que pueden actuar como antioxidantes y mediante estos se ha llegado a postular que el efecto antioxidante encontrado en algunas las plantas se atribuye a la presencia de grupos hidroxilo como sustituyentes en los compuestos fenólicos (Granados *et al.*, 2012).

El aceite esencial de *O. vulgare* tiene actividad antiradicalaria y esta propiedad se atribuye a los fenoles carvacrol y timol (Granados *et al.*, 2012). Varios investigadores confirman el potencial antioxidante de los extractos y los AE obtenidos de diferentes variedades de orégano (*O. vulgare*, *O. compactum*, *O. majorana*) (Baratta *et al.*, 1998). Lecona *et al.* (2003) evaluaron el potencial antioxidante del AE de orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth) obtenido de las hojas secadas a la sombra y al sol, los resultados muestran que la mejor actividad antioxidante, determinada con el método del  $\beta$ -caroteno, se obtuvo con el aceite proveniente de las hojas secadas a la sombra.

Las propiedades antioxidantes de los AE utilizando especies animales han sido abordados por Youdim y Deans (1999, 2000), utilizando ratas alimentadas con dietas enriquecidas con aceite de tomillo y timol. Se ha observado que estos animales mantienen altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados en las fracciones fosfolipídicas provenientes de los diferentes tejidos. Estos suplementos actúan como un atrapador de radicales libres e influyen en el sistema de defensa antioxidante *in vivo* en el animal. En otros estudios realizados con gallinas ponedoras, se observó que hay disminución en la oxidación lipídica de la yema de los huevos provenientes de los animales suplementados con timol y que ha sido almacenada bajo refrigeración; las mediciones se realizaron determinando la formación de malondialdehído, prolongando el tiempo de almacenamiento y reduciendo o eliminando la necesidad de una estabilidad oxidativa adicional (Botsoglou *et al.*, 1997).

Se ha considerado que el timol y el cimeno-2,3-diol son los responsables de la actividad antioxidante del tomillo y se ha determinado la concentración de estos metabolitos en los huevos colectados durante un período de alimentación de 24 días; se observó que aproximadamente el 0,004% de cimeno-2,3-diol y 0,006% de timol se transfirieron a la yema del huevo después de 12 días de alimentación, y los compuestos desaparecieron tan pronto se suspendió la ingesta (Krause y Ternes, 1999). La suplementación dietaria con hierbas y sus extractos son una estrategia simple y muy conveniente para introducir antioxidantes naturales en la comida de las aves. Los resultados presentados en éstos estudios muestran un aumento en la capacidad antioxidante de los tejidos de los pavos, como un resultado de la suplementación dietaria con aceite de orégano y /o acetato de  $\alpha$ -tocoferol. La inclusión del AE de orégano en una proporción de 200 mg/kg de dieta fue más efectiva en inhibir la oxidación lipídica que la inclusión de solamente 100 mg/kg, la cual fue equivalente a la inclusión de 200 mg/kg de acetato de  $\alpha$ -tocoferol (Botsoglou *et al.*, 2002; Botsoglou *et al.*, 2003; Papageorgiou, *et al.*, 2003). Por otro lado, Marcincak *et al.* (2008) demostraron que la adición del AE de orégano en las dietas alimenticias de los pollos fue más efectivo en el retardo de la oxidación al ser comparada con la dieta control.

## **1.8. ESPECIES DE OREGANO DE LA ZONA NORTE DEL DEPARTAMENTO DE BOLIVAR: OREGANO (*Origanum vulgare*), OREGANO “BORDE BLANCO” (*Origanum vulgare ssp*) Y OREGANITO (*Lippia alba* Mill)**

### **1.8.1 Estudio Botánico**

El orégano, cuyo nombre científico es *Origanum vulgare*, pertenece a la familia lamiaceae (labiatae). Es una planta herbácea vivaz muy aromática; sus hojas (tanto frescas como secas) se emplean como condimento en numerosas recetas culinarias por el excelente sabor que le confieren a las comidas.

Con base en criterios morfológicos, el género *Origanum* se ha clasificado en 3 grupos, 10 secciones, 38 especies, 6 subespecies y 17 híbridos (Skuola, 1999). Lawrence (1998) considera que el orégano que se utiliza comúnmente con propósitos culinarios se puede agrupar en cuatro grupos: el griego (*Origanum vulgare ssp. Hirtum* (Link) letswaart), el español (*Coridohymus capitatus* (L.) Hoffmanns y Link), el turco (*Origanum onites* L.) y el mexicano (*Lippia graveolens* Kunth) (Russo 1998).

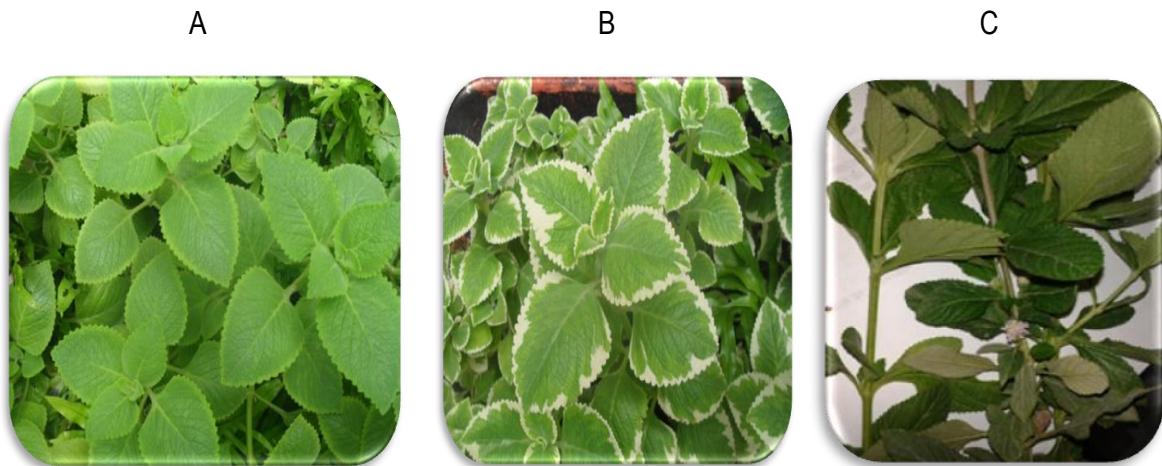


- **Nombre científico:** *Origanum vulgare* (Figura 7)
- **Familia:** Lamiaceae (Labiadas).
- **Otros nombres populares:** Marjolaine sauvage (Francés), Wild marjoran (Inglés) Origano comune (Italiano) Dost, wilder Majoran (Alemán).
- **Lugar de origen:** Europa central, meridional y Asia central.

La planta ***Lippia alba* Mill** N.E. Brown ex Britton & Wills, es un sub-arbusto muy aromático, ampliamente distribuida y crece espontáneamente en América Central y del Sur (Gupta, 1995). La planta es conocida también como *Lippia geniculata* HBK o *Lantana alba* Mill, y en Colombia por sus nombres populares “Pronto alivio” (Antioquia), “Curatodo”, “Orégano de cerro” (Magdalena) y oreganito (Bolívar).

- **Nombre científico:** *Lippia alba mill* (Figura 7)
- **Familia:** Verbenaceae
- **Otros nombres populares:** oreganito (departamento de Bolívar)

Esta especie se ha empleado para aliviar enfermedades estomacales y como antiespasmódica, se consume en infusión en forma de te; también se ha usado como sedante, desinfectante, diaforética y emenagoga (García Barriga, 1992). La planta se caracteriza por su olor intenso y penetrante y contiene de 0.1 a 1.2% de aceite volátil. La composición química del AE de *L. alba* depende sensiblemente del origen geográfico, de las condiciones de cultivo, la edad y la parte de la planta empleada para la extracción; igualmente también influyen otros factores geobotánicos; lo anterior queda evidenciado con los trabajos realizados sobre la composición química de *L. alba* en Guatemala (Senatore *et al.*, 2001), India (Bahl *et al.*, 2000, 2002), Uruguay (Lorenzo *et al.*, 2001), Cuba (Pino, *et al.*, 1997) y Brasil (Zoghbi *et al.*, 1998).



**Figura 7. Especies y subespecies de orégano cultivadas en la Zona Norte del departamento de Bolívar. A: Orégano (*Origanum vulgare*), B: Orégano Borde Blanco (*Origanum Vulgare ssp*) y C: Oreganito (*Lippia alba*)**

## **1.9 PALMA DE ACEITE (*Elaeis guineensis*)**

### **1.9.1. Generalidades**

El aceite de palma obtenido de los frutos de la especie *Elaeis guineensis*, conocida como palma africana o palma de aceite, constituye la segunda fuente más abundante de aceite vegetal a nivel mundial (Cottrell, 1991) contiene entre 500 a 2000 mg de caroteno/kg y aproximadamente 500 mg de tocoferoles y tocotrienoles (Go SH, *et al.*, 1985, Nagendran, *et al.*, 2000), y un alto contenido de antioxidantes solubles en agua: ácidos fenólicos y flavonoides (Sundram, *et al.*, 2003).

La palma de aceite es una planta tropical propia de climas cálidos que crece en tierras por debajo de los 500 metros sobre el nivel del mar. Su origen se ubica en el golfo de Guinea en el África occidental, de ahí su nombre científico *Elaeis Guineensis Jacq.* y su denominación popular: palma africana de aceite (Meunier, *et at.*, 1976).

Los estudios realizados por el Ministerio Agricultura y Desarrollo Rural de la República de Colombia, presentados en su boletín número 2 de febrero del año 2010, indican que la producción del aceite de palma en el año 2009, fue de 802.000 toneladas, y ha tenido una producción creciente del 60% en los últimos 10 años; la producción mundial referida al año 2012 alcanzó 974 toneladas (Fedepalma,

2013), los mayores productores son Indonesia y Malasia con el 85% de la producción mundial, le siguen en orden de importancia Tailandia, Colombia (2.0% de la producción total), Papúa, Nueva Guinea, Costa de Marfil, Ecuador, Honduras, Ghana, Camerún, Costa Rica y Perú.

Físicamente, la palma africana está compuesta por un tallo erecto de 40 a 45 centímetros de diámetro, que crece de 35 a 70 centímetros por año; una corona formada por 40 a 45 hojas compuestas, las cuales emergen continuamente a un ritmo de 25 a 35 por año. Cada hoja consta de numerosos folíolos, unidos al raquis, que a su vez está unido al tallo por el peciolo (Escobar, 1996).

La palma aceitera es monoica, o sea produce inflorescencias masculinas y femeninas en un mismo árbol. Sin embargo, la polinización es cruzada, y las flores de uno u otro sexo son producidas a tiempos diferentes en la misma planta. La producción de inflorescencias es continua a lo largo de todo el año, pero el sexo de sus flores es determinado por condiciones ambientales y por el estrés. Una vez que las flores son fecundadas se inicia el desarrollo del racimo, en donde los frutos alcanzarán la madurez después de 5,5 a 6 meses; por lo general cada racimo tiene de 600 a 1500 frutos que poseen forma esférica a ovoide con color pardo en la punta y anaranjado en la parte media hacia la base; la longitud es de dos a cinco centímetros, con un peso de tres a treinta gramos. Entre la cáscara y la semilla está la pulpa o mesocarpio, que es de color anaranjado cuyo contenido de aceite varía entre un 50 y 70 %. La semilla o coquito también posee aceite y se le conoce con el nombre de aceite de almendra (Hartley, 1984).

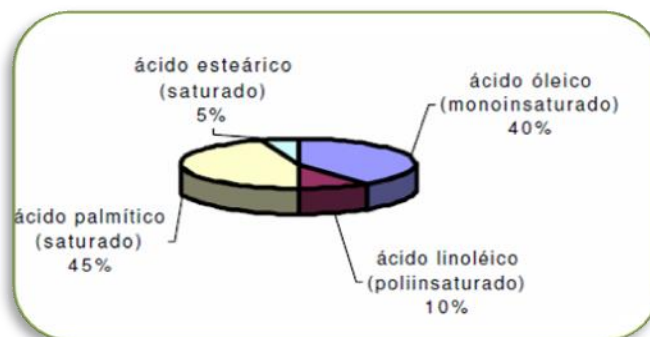
## **1.9.2 Características del aceite rojo de palma**

### **1.9.2.1 Propiedades químicas**

El aceite de palma es un aceite con un contenido de glicéridos saturados alto, lo cual le confiere una consistencia semisólida que es muy valorada porque no requiere pasar por el proceso de hidrogenación, el cual sí es requerido para modificar la consistencia de otras grasas o aceites de origen vegetal para obtener la consistencia adecuada (Quesada, 1998).

El aceite de palma es rico en vitaminas E y A,  $\beta$ - carotenos y antioxidantes como los tocoferoles y tocotrienoles. Contiene una relación 1:1 entre ácidos grasos saturados e insaturados, es decir que el 50% son saturados, los demás son ácidos grasos insaturados. De los saturados, el 45%

corresponde al ácido palmítico y el 5% al ácido esteárico; y de los no saturados, el 40% corresponde al ácido oleico (monoinsaturado) y el 10% al ácido linoléico (poliinsaturado) (Araya, *et al.*; 1986). Lo anterior se puede observar en la Figura 8.



**Figura 8. Composición porcentual de los ácidos grasos presentes en el aceite rojo de palma africana. (*Elaeis guineensis*).**

#### 1.8.2.2 Alteración de la materia grasa en la elaboración de alimentos

Debido a la sensibilidad que tienen las grasas y los aceites para desarrollar rancidez oxidativa, su utilización en la elaboración de alimentos conlleva un riesgo potencial que está relacionado con su preservación (Valenzuela and Nieto, 1995). Según Crapiste *et al.* (1999), la rancidez oxidativa es la mayor causa de pérdida de calidad en los aceites durante el almacenamiento, y es favorecida por las temperaturas elevadas y la disponibilidad de oxígeno.

Los aceites y grasas de fritura con un alto contenido de ácidos grasos insaturados son más susceptibles a la rancidez oxidativa que aquellos con altos niveles de ácidos grasos saturados (Braverman, 1980; Petukhov *et al.*, 1999). Según Barrera and Arellano (2002), la rancidez es definida como “la alteración de los aceites y grasas que puede ser detectada organolépticamente”, debido a que ocasiona la aparición de olores y sabores indeseables que deprecian el producto alimenticio y disminuyen su valor nutricional.

El Deterioro oxidativo, también llamado autoxidación, es el factor más importante que afecta la calidad de los aceites y grasas. El proceso se genera por la reacción del oxígeno atmosférico con los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados. Esta reacción genera los productos primarios de la

oxidación (peróxidos e hidroperóxidos), los cuales mediante una serie de reacciones paralelas de ruptura de cadena producen los compuestos secundarios de la reacción que pueden ser volátiles, como aldehídos, cetonas y ácidos, o no volátiles como dímeros, trímeros y polímeros (Barrera y Arellano, 2002). Otros autores señalan que las grasas y aceites se oxidan debido al mecanismo de reacciones en cadena que propician los radicales libres; es decir, en la reacción se generan radicales libres inestables que catalizan la producción de más radicales libres (Sherwin, 1979; Adams, 1997; Medina, 1997).

La autoxidación se produce a través de un mecanismo de radicales libres que consiste en una reacción en cadena de tres pasos (Figura 9).

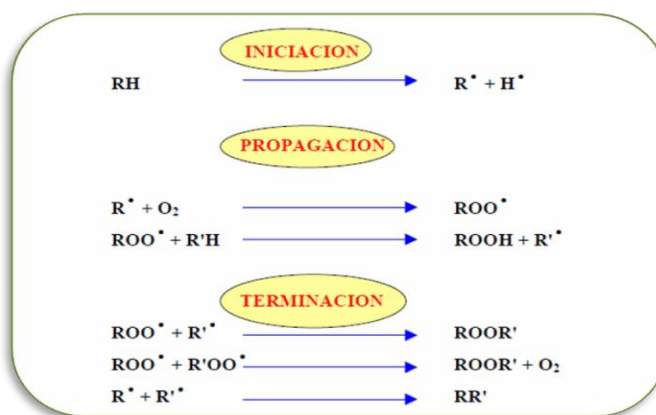


Figura 9. Mecanismo de la autoxidación, mediante radicales libres

### 1.9.2.3 Mecanismo de autooxidación de aceites y grasas mediante radicales libres

**Etapas de inicio o tiempo de inducción.** Durante esta etapa se produce la ruptura homolítica del hidrógeno unido al carbono de la posición alfa con respecto al doble enlace, formándose así los radicales libres inestables  $R^\cdot$  y  $H^\cdot$  (Fennema, 1985; Morrison and Boyd, 1990). Esta reacción es acelerada fundamentalmente por la exposición de las materias grasas al oxígeno, calor, luz, humedad y trazas de metales (Fe, Cu, Mg, Ni), y es inhibida por la presencia de antioxidantes (Dustan and Harris, 1994).

**Etapas de propagación o periodo de oxidación.** Normalmente los radicales libres desaparecerían rápidamente al combinarse, pero en presencia de oxígeno molecular las posibilidades incluyen el

choque entre el radical libre  $R^\cdot$  y el  $O_2$ , resultando el radical peróxido  $ROO^\cdot$  (Braverman, 1980). Este radical reacciona luego con una molécula de lípido sin activar ( $R'H$ ) generándose el hidroperóxido  $ROOH$  y el radical libre  $R^\cdot$ , a través del cual se propaga la reacción en cadena (Braverman, 1980; Nawar, 1991; Finne *et al.*, 1998).

**Etapas de terminación.** En esta última etapa los radicales libres que provienen de la descomposición de los hidroperóxidos se asocian para dar compuestos estables. La ruta que siguen los radicales libres y los radicales peróxidos depende de la presencia de catalizadores, radiaciones ionizantes y la temperatura (Badui, 1986; Medina, 1997). Los productos finales de reacción incluyen compuestos carbonílicos de cadena corta como aldehídos y cetonas; estos materiales son los responsables del sabor rancio y de las reacciones laterales que conducen a un deterioro generalizado del aceite (Braverman, 1980; Badui, 1986, Medina, 1997).

#### 1.9.2.4 Calidad del aceite de palma

Como cualquier otro tipo de grasa o aceite, el aceite rojo de palma se ve afectado por factores externos que comprometen su calidad. Así se tiene que ésta está ligada directamente a ciertos cuidados que hay que tener en todas las etapas de su procesamiento incluyendo la cosecha, la extracción, el almacenamiento y transporte. (Orthofer, *et. al.*, 1991).

El principal factor que influye en la calidad del aceite rojo de palma es la elevación del nivel de oxidación; la cual se refiere a la reacción que se da entre los enlaces dobles presentes en las grasas insaturadas y el oxígeno atmosférico la reacción genera compuestos oxidados como aldehídos o cetonas y ácidos grasos libres de cadena corta, que conducen a la alteración de las características sensoriales del producto y la formación de la rancidez en el aceite. Es por ello que durante la cosecha los frutos deben ser colectados en el punto de madurez óptimo y procesado inmediatamente; se debe evitar todo daño físico para impedir que la acidez provocada por la hidrólisis enzimática, pueda deteriorar el mesocarpio del fruto (Potter, 1973, Patterson, 1989).

Durante la etapa de almacenamiento y transporte hay que tomar precauciones para evitar la presencia de humedad en el aceite, ya que ésta favorece la oxidación, compromete la vida útil del

aceite y causa problemas en los procesos de purificación y refinación (Peixoto, 1986; Patterson, 1989). La calidad de los aceites se fundamenta en una serie de características que deben mantener, en la Tabla 4 se muestran alguna de ellas.

**Tabla 4. Características fisicoquímicas destacables de un aceite de palma de excelente calidad**

CARACTERISTICAS DE UN ACEITE DE PALMA	NIVELES OPTIMOS
Ácidos grasos libres	< 5%
Humedad	< 0,5 %
Índice de peróxidos	< 5%
Impurezas	< 0,01 %
Hierro	< 3,5 ppm
Cobre	< 0,2 ppm

Fuente: Quesada (1998).

#### 1.9.2.5 Uso de antioxidantes para mantener la calidad del aceite comestible de palma

Los antioxidantes sintéticos actualmente se utilizan en la industria de producción de medicamentos, cosméticos, alimentos para animales y materiales para el consumo humano. Los más usados son aquellos que presentan una estructura fenólica en sus moléculas y son utilizados regularmente como aditivos en los alimentos (Kurechi, *et al.*, 1980).

Existen dos categorías fundamentales de compuestos que se utilizan para evitar el deterioro oxidativo de los lípidos: los donadores de protones y los secuestradores de protones. Entre los primeros están: butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), terbutilhidroxiquinona (TBHQ) y el galato de propilo, estos compuestos no detienen la formación de los radicales libres durante la oxidación, sino que reaccionan con ellos y los atrapa produciendo un nuevo radical en el compuesto antioxidante que es estabilizado por efectos de resonancia, este efecto evita que se presente la etapa de propagación del radical; bajo estas circunstancias, el antioxidante se consume en la

reacción y por lo tanto la estabilidad del lípido en el tiempo dependerá de la cantidad residual de aditivo que aun contenga (Belitz y Grosh, 1998; Mazza, 2000).

Se conoce que el aceite crudo de palma contiene sus propios antioxidantes (tocoferoles, vitamina E), pero estos no son suficientes para evitar la oxidación natural a la que se ve sometido el aceite. Una alternativa para reducir este problema es la utilización de antioxidantes sintéticos, como el butil hidroxil tolueno (BHT). Este compuesto es liposoluble, por lo que se usa como antioxidante en concentraciones menores a 0.02 % del peso del producto final. Además, es posible combinarlo con otras sustancias, ya que presenta sinergismo en su actividad (Baduit, 1997).

El BHT, es un polvo cristalino de color blanco ligero olor fenólico y punto de fusión de 69 °C, insoluble en agua y en propilenglicol pero soluble en etanol, aceites y parafinas; es clasificado como un antioxidante fenólico impedido. Se considera más efectivo cuando es adicionado a las grasas animales que a los aceites vegetales, protege el olor y el aroma de los aceites esenciales y controla la oxidación de las grasas que poseen como componentes mayoritarios los ácidos grasos de cadena corta (Cubero *et al*, 2002).

El BHT es un antioxidante sintético procedente de la industria petroquímica procesado como aditivo alimentario (Amarowicz *et al*, 2000), se utiliza casi siempre mezclado con el BHA (E-320), que tiene las mismas aplicaciones; y limitaciones legales. Esta sustancia no es mutagénica pero, como el BHA, es capaz de modificar la acción de ciertos carcinógenos, se elimina en la orina combinado con otras moléculas, provenientes de una vía metabólica común. El BHT suministrado en dosis muy altas, produce lesiones hemorrágicas en ratas y ratones, pero este deterioro no ha sido observado en otras especies animales (Branen, 1975).

El BHA comercial es una mezcla de dos isómeros, el y el 2-*ter*-butil-4-hidroxianisol, en la composición predomina el isómero 3-*ter*-butil-4-hidroxianisol llegando a ocupar el 90%, funde a 48-65 °C, es insoluble en agua, y soluble en propilenglicol, aceites vegetales y parafinicos, el BHA está considerado como un antioxidante fenólico impedido que no presenta problemas de reversión al aumentar la concentración hasta niveles del 0.02%. Este antioxidante es el más utilizado comercialmente, desde los años cuarenta se utiliza como aditivo alimentario (Kurechi y Kato, 1980),



debido a su alta capacidad antioxidante, estabilidad a las variaciones del pH y por su sinergismo con otros antioxidantes como el galato de propilo (Cubero *et al*, 2002)..

El BHA es muy eficaz para contrarrestar la peroxidación de las grasas de fritura, ya que no se descompone o evapora, como lo hacen los galatos o el BHT, además es absorbido por el producto frito protegiéndolo del deterioro oxidativo, en la industria alimenticia se utiliza para proteger las grasas utilizadas en repostería, fabricación de bizcochos, sopas deshidratadas, entre otros; sin embargo, su seguridad ha sido cuestionada extensamente (Lemberkovics, 1998). No tiene acción mutagénica, pero es capaz de modular el efecto de ciertos carcinógenos en animales de experimentación (Branen, 1975).

El *tert*-butilhidroquinona (TBHQ), es un polvo cristalino de color blanco, soluble en etanol y éter y poco soluble en agua, es considerado como el mejor antioxidante para aceites de frituras, no es muy eficaz en panificación y horneado, es soluble en grasas y aceites y tiene la ventaja de no formar complejos con el hierro y el cobre, como ocurre con los galatos; por lo tanto no requiere de agentes quelantes para impedir la formación de compuestos coloreados, su utilización no está autorizada en la Unión Europea y esta permitida en Estados Unidos y otros países (Cubero *et al*, 2002).

Los galatos están aprobados por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) como aditivo alimentario con la regulación 21 CFR 184.1660; por el USDA (Departamento de agricultura de los EE.UU.) con regulación 9 CFR 318.7 y por la Comunidad Europea (EC) con la regulación (E-310). Estos derivados naturales, son una alternativa a los antioxidantes sintéticos tradicionales, son empleados como preservantes y antioxidantes con grado alimentario para grasas, aceites y esencias. Puede combinarse con otros productos antioxidantes atóxicos; por ejemplo, con el palmitato de ascorbilo, para conseguir efectos sinérgicos; es común mezclarlo con compuestos quelantes de grado alimentario para inactivar trazas metálicas (hierro y cobre) y evitar la formación de colores no deseados. El galato de propilo es utilizado como antioxidante en los aceites vegetales, productos cárnicos, papas fritas, bases para sopas especialmente de pollo, chicle, entre otros. Los galatos retardan el deterioro de las grasas y aceites se utilizan muy a menudo mezclados con BHA y BHT, debido al efecto sinérgico que tienen entre si estos aditivos. Se recomienda utilizar concentraciones de 0.02% basado sobre el total de grasa o aceite contenido en el alimento (Multon, 2000; Cubero *et al*, 2002).

El Galato de propilo es el nombre con el cual se conoce al 3, 4, 5-trihidroxi benzoato de *n*-propilo. Este derivado del ácido gálico es obtenido a partir de las vainas del árbol de Tara del Perú (*Caesalpinia Spinosa* o *Tintorea kuntze*). Comercialmente se encuentra en forma de polvo cristalino de color blanco o crema, con punto de fusión de 148 °C, inodoro, tiene apariencia áspera y dura al tacto, su gusto es ligeramente amargo y astringente (Cubero *et al*, 2002). Se encuentra comercialmente como: E-310 galato propilo, E-311 galato de octilo, o E-312 galato dodecilo.

#### **1.9.2.6 Propiedades nutricionales del aceite de palma**

El aceite de palma es un alimento natural que es consumido desde hace aproximadamente 5000 años. Su proceso de refinación se inicio aproximadamente hace 50 años, debido a los requerimientos del público consumidor que esta acostumbrado a ingerir aceites con muy bajo color y prácticamente inodoros. El proceso de refinación se realiza sin la utilización de disolventes, por lo que se disminuye el riesgo de contaminación por residuos; además, no se practica el proceso de hidrogenación, ya que el aceite de palma tiene una consistencia semisólida que es adecuada para muchas aplicaciones, de esta forma se evita la formación de ácidos grasos *trans*, que tienen un efecto negativo sobre la salud. Se debe considerar que la refinación elimina compuestos nutricionales como fuentes vitamínicas y energéticas que son de gran valor (Stashenko, *et al.*, 2010).

El aceite de palma sin refinar presenta un color rojo debido a la presencia de carotenoides, y su contenido varía de acuerdo al grado de madurez y al genotipo. El promedio observado en cultivares comerciales es de 600 ppm, por lo que si este aceite no es decolorado ni neutralizado puede ser considerado como una excelente fuente de pro-vitamina A; el aceite de palma proporciona 4546 equivalentes de retinol por 100 g, lo que indica que alrededor de 20 g de aceite crudo de palma africana sin refinar pueden cubrir los requerimientos diarios de un adulto. En los estudios realizados con ratones de laboratorio, se ha observado un efecto inhibitor en el desarrollo de cáncer de mama (Stashenko, *et al.*, 2010).

De todos los aceites de origen vegetal, el aceite rojo de palma africana sin refinar contiene una gran cantidad de antioxidantes del tipo de los tocoferoles y tocotrienoles, los cuales se encuentran aproximadamente en una concentración de 500 a 800 ppm. Del total de estos tocoferoles, un 35%

corresponde al alfa-tocoferol, precursor de la vitamina E. Una ingesta adecuada de vitamina E protege a las estructuras de las membranas celulares y de los organelos debido a sus propiedades antioxidantes; es decir, que actúa como protector contra el envejecimiento celular. Además, la vitamina E confiere una gran estabilidad a los dobles enlaces de los aceites y contribuye a evitar la oxidación de los ácidos grasos esenciales, por lo que se disminuye el riesgo de enfermedades como el cáncer (Peixoto, 1986; Quesada, 1998).

Como todos los aceites de origen vegetal, el aceite rojo de palma sin refinar no contiene colesterol; pero tiene fitoesteroles, los cuales interfieren con la absorción intestinal de este metabolito. También tiene una alta concentración de ácidos grasos monoinsaturados en forma de ácido oleico los cuales ayudan a reducir el colesterol, disminuyendo los riesgos de una alta disponibilidad de éste para el organismo y atenuando el peligro de enfermedades coronarias. Cabe mencionar que el ácido palmítico es un componente importante del aceite de palma, y a pesar de ser un ácido graso saturado no es hipercolesterolémico como otros (Stashenko, *et al.*, 2010).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la composición química y la actividad antioxidante del aceite esencial foliar extraído de las especies de orégano (*Origanum vulgare*), orégano “borde blanco” (*Origanum vulgare ssp*) y oreganito (*Lippia alba* Mill), cultivado en la zona norte del departamento de Bolívar, (Colombia).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las propiedades físicas y la composición química de los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare*), orégano “borde blanco” (*Origanum vulgare ssp*) y oreganito (*Lippia alba* Mill), obtenidos mediante hidrodestilación por arrastre con vapor e hidrodestilación asistida por radiación con microondas.
- Evaluar *in vitro* la actividad antioxidante de los aceites *esenciales* extraídos empleando los métodos DPPH, ABTS y ORAC, y comparar la actividad con un patrón de referencia.
- Establecer el deterioro oxidativo y las propiedades fisicoquímicas de un aceite de palma al cual se le ha incorporado un aceite esencial como agente antioxidante.

### 3. METODOLOGIA

Para garantizar el cumplimiento de los objetivos planteados, el presente trabajo de investigación fue dividido en 5 etapas y en cada una de ellas se realizó el siguiente trabajo experimental (Figura 10):

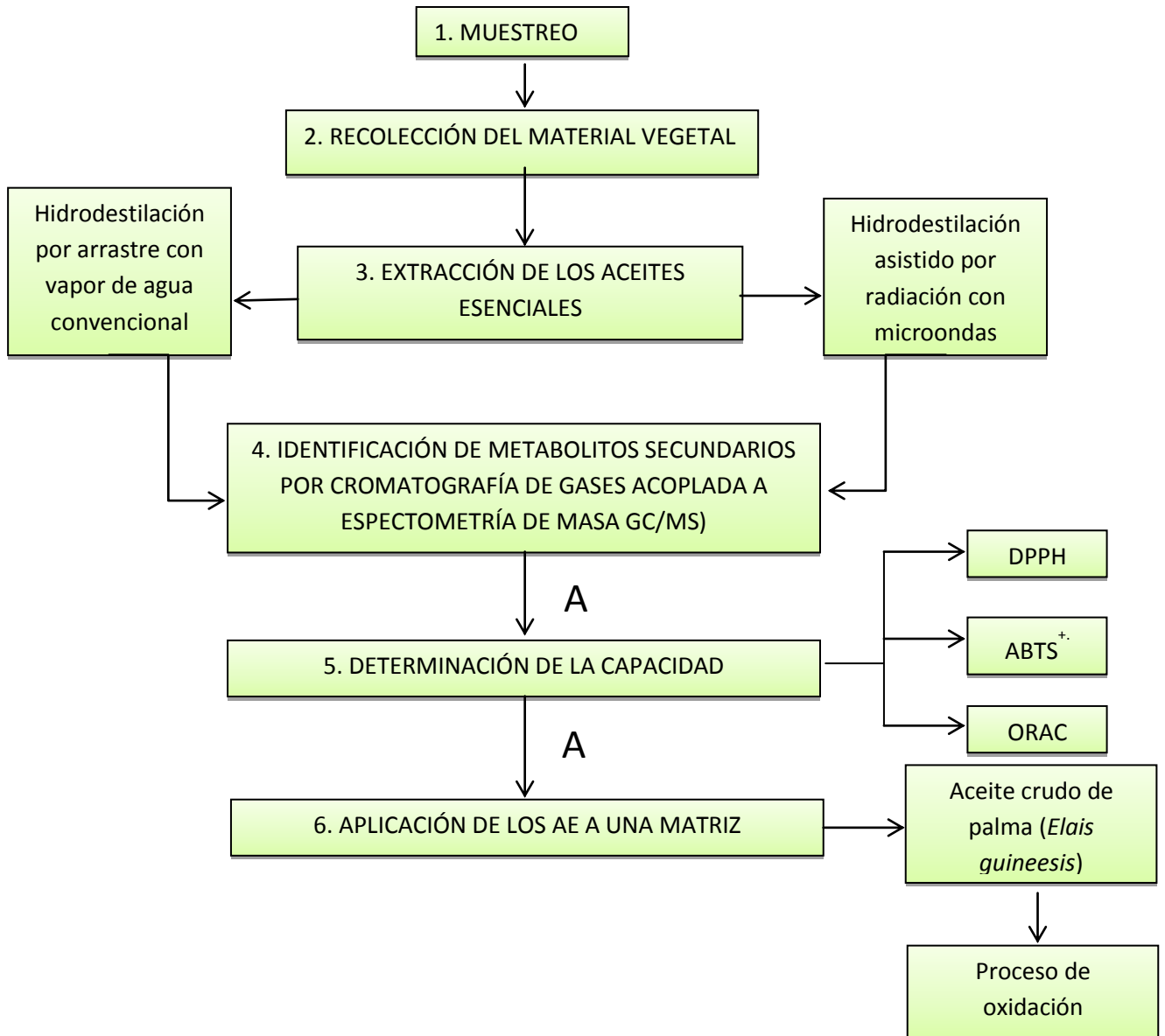


Figura 10. Diagrama de bloques de la metodología de trabajo desarrollada durante el proyecto

### 3.1 OBTENCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES (AE) DE LAS DIFERENTES VARIETADES DE OREGANO Y DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

#### 3.1.1 Recolección del material vegetal

Las hojas de las plantas Orégano (*Origanum Vulgare*), Orégano Borde Blanco (*Origanum vulgare ssp*), y Oreganito (*Lippia alba mill*) fueron identificadas en el herbario Gabriel Gutiérrez V. (MEDEL), registro nacional de colecciones biológicas con baucher N° 016 (Anexo 1).

Con base en los registros de las colecciones, las facilidades de desplazamiento y las condiciones ambientales se escogieron tres (3) variedades de orégano cultivadas en el departamento de Bolívar (Colombia); el orégano (*Origanum vulgare*) y el oreganito (*Lippia alba mill*) fueron colectadas en el corregimiento de Membrillal; el orégano borde blanco (*Origanum vulgare ssp*) en la ciudad de Cartagena. Con la Cartografía del municipio, suministrada por la secretaria de Agricultura del Departamento de Bolívar y mediante monitoreos preliminares, se determinaron los lugares con la mayor abundancia de individuos cultivados. Se establecieron dos sistemas prediales para el cultivo y la obtención del material vegetal de alta calidad, fresco y en cantidades suficientes para satisfacer los requerimientos de este trabajo de investigación. En cada sistema de producción agrícola se efectuó el seguimiento y monitoreo del desarrollo vegetativo de cada especie; se tuvieron en cuenta el crecimiento de las plantas, el color y tamaño de las hojas, la altura de las plantas y se controló su manejo fitosanitario con el fin de obtener un material de alta calidad bajo una producción limpia. De cada una de las especies: se recolectaron 2000 g de hojas por semana, entre los meses de febrero del 2012 y noviembre del mismo año. Todas las cosechas se efectuaron con la coordinación y supervisión del ingeniero agrónomo Antonio Carlos Bustillo Simancas, con el fin de garantizar la selección y calidad de las especies recolectadas.

Las muestras del orégano fueron recolectadas de la siguiente forma: El Orégano (*Origanum Vulgare*) y Oreganito (*Lippia alba mill*) se realizaron en el barrio Membrillal, cerca de la carretera que conduce a la zona industrial de Cartagena, aproximadamente a 12 kilómetros de la región sur-oriental.

El orégano “borde blanco o variegado (*Origanum vulgare ssp*) se recolectó en el municipio de Cartagena, en el centro de la ciudad; las muestras escogidas correspondieron a plantas adultas

cultivadas en jardín, por ser esta una especie considerada como ornamental debido a su coloración llamativa y por el olor agradable que posee. El material vegetal se empacó en bolsas plásticas oscuras y se preservó bajo refrigeración hasta el día de su procesamiento.

**3.1.2 Procesamiento del material vegetal:** las hojas colectadas fueron lavadas con agua para eliminar las impurezas, especialmente residuos de tierra; el lavado no fue excesivo para evitar la pérdida de algunos componentes solubles. Después del lavado se hizo la selección de las hojas, las cuales se trocearon con la mano, se pesaron en una balanza (PCE-BSH 6000), y se emplearon para la extracción inmediatamente.

**3.1.3 Extracción del AE:** la obtención del AE de cada una de las especies vegetales se realizó por dos métodos: hidrodestilación convencional por arrastre con vapor de agua e hidrodestilación asistida por microondas. Se empleó un equipo de hidrodestilación con capacidad para 4 litros. Se tomaron 500 g de material vegetal, seleccionado y troceado, que luego fueron introducidos en el balón de extracción, conteniendo 500 mL de agua destilada. Tanto en el proceso de arrastre con vapor empleando manta de calentamiento como en el que se empleó asistencia con microondas, el tiempo de extracción fue de 3–4 horas. Como fuente de radiación microondas se empleó un horno convencional marca Samsung modificado, con un 1 ciclo de irradiación de 60 minutos y una potencia del 70% (Lucchesi, 2006). En ambos casos el AE se colectó en un recipiente tipo Dean Steark.

El AE se separó por decantación, e inmediatamente se almacenó en un vial de vidrio color ámbar de 4 mL que se mantuvo bajo refrigeración (Stashenko, *et al.*, 2010; Granados *et al.*, 2012). El rendimiento de la extracción del AE se calculó mediante la ecuación 1:

$$\% \text{ Rendimiento} = [(W_{AE}) / (W_{mv})] \times 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde,  $W_{AE}$  es el peso (g) obtenido del aceite esencial y  $W_{mv}$  corresponde al peso en gramos (g) del material vegetal fresco.

**3.1.4 Determinación de propiedades físicas del AE:** a cada muestra de AE se le midieron las siguientes propiedades físicas:

- **Densidad relativa del aceite esencial a 20°C:** se empleó el método oficial AOAC 920.212:1995. Para ello se utilizó un picnómetro limpio y seco de 1.0 mL de capacidad, el cual se pesó vacío en una balanza electrónica de cuatro decimales hasta que se obtuvo un peso constante; seguidamente se llenó con 1 mL del aceite esencial, se tapó y se limpió el exceso de muestra. Luego, se pesó el conjunto y por diferencia de pesos se determinó la densidad relativa del AE empleando la ecuación 2.

$$\text{Densidad } \rho \text{ (g/mL)} = \frac{[(\text{Peso del picnómetro} + \text{muestra}) - (\text{peso del picnómetro})] \text{ (g)}}{\text{Volumen del aceite esencial (mL)}} \quad (\text{Ecuación 2})$$

- **Índice de refracción de los aceites esenciales:** se utilizó el método oficial AOAC 921.08:1995 (AOAC, 1990). La prueba fue realizada utilizando un refractómetro marca Sper Scientific; previo a la determinación se limpió el prisma del refractómetro con etanol y agua destilada. Con la ayuda de un capilar se depositaron dos gotas de AE y se procedió con la lectura a 20 °C.
- **Solubilidad de los AE en etanol (70% v/v):** en un tubo eppendorf de 1,5 mL se adicionaron 100 µL de etanol al 70% v/v y 2 µL del AE; La mezcla se homogenizó en un vortex a 20 rpm hasta que la muestra quedó totalmente homogénea.
- **Rotación óptica:** Se preparó una disolución al 10% p/v del AE en etanol (96%) grado analítico. El análisis fue realizado en un polarímetro marca Sper Scientific, empleando una celda de 10 mL; la lectura se realizó a 20 °C y 589 nm (línea D del sodio).

### 3.2 DETERMINACION DE LOS COMPONENTES MAYORITARIOS DEL AE MEDIANTE CROMATOGRAFIA GASEOSA-ESPECTROMETRIA DE MASAS (GC/MS)

Se utilizó un cromatógrafo Agilent 7890A/5975C, en interfase con un detector selectivo de masas HP5973 Network, conectado en línea con un sistema HP-MS ChemStation y la base de datos NIST-2008. Cada muestra de AE (50 µL) se disolvió en 450 µL de diclorometano; se inyectaron 1,0 µL en el modo split (20:1), la temperatura del inyector fue de 250 °C, se utilizó una columna capilar HP-



5MS 5% Phenyl Methyl Silox (30m x 250 µm x 0.25 µm); como gas de arrastre se empleó Helio (Aga-Fano) a flujo constante de 1 mL/min, presión del gas 7.6354 psi y velocidad lineal de 36 cm/seg. La temperatura inicial fue 45 °C y la temperatura de la línea de transferencia de 280 °C. Los espectros de masas (EM) se obtuvieron por ionización electrónica (70 eV) con barrido automático en el rango de masas m/z 30-400 u.m.a. a 3.85 scan/s. La identidad de los componentes se asignó por comparación de cada espectro con los estándares de la base de datos NIST-2008 y los datos reportados en la literatura (Tomy *et al.*, 1997; Baharum *et al.*, 2010).

### 3.3 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS AE

Para determinar la actividad antioxidante de cada AE se emplearon tres metodologías: DPPH, ABTS<sup>+</sup> y ORAC. De forma exploratoria, se realizaron ensayos preliminares a una concentración de 100 mg/L para cada muestra de AE y de acuerdo a los resultados obtenidos se evaluó la capacidad antioxidante a diferentes concentraciones.

#### 3.3.1 Método Del Radical DPPH•

La actividad captadora de radicales libres DPPH• se determinó empleando el método descrito por Silva *et al.* 2004 (con algunas modificaciones 75 µL de muestra fueron adicionados a 150 µL de una solución metanólica de DPPH• (100 ppm) y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min, luego de los cuales se determinó espectrofotométricamente la desaparición del radical DPPH• a 405 nm en lector de microplacas Multiskan Ex (Thermoscientific). Se utilizó ácido ascórbico (25 µg/mL como control positivo de captación de los radicales DPPH•). La IC<sub>50</sub> se determinó evaluando varias concentraciones seriadas de la muestra mediante análisis de regresión lineal. Los resultados se expresan como la media ± E.S.M del porcentaje de captación del radical DPPH• relativo al grupo control. Diferencias frente a la solución estándar de DPPH fueron determinadas mediante análisis de varianza ANOVA, los valores de  $P < 0,05$  fueron considerados significativos. Se calculó el porcentaje de inhibición (% Inh) usando la ecuación (3).

$$\% \text{ Captación} = [(\text{Abs DPPH} - (\text{AbM} - \text{AbB}) / \text{Abs DPPH}] \times 100 \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde Abs DPPH: Absorbancia del control negativo, AbM: absorbancia de la muestra; AbB: absorbancia de la muestra, respectivamente.

### 3.3.2 Método Del Radical ABTS.+

La actividad captadora del radical libre ABTS• se determinó empleando el método descrito por Re *et al.* (1999) con algunas modificaciones. El radical ABTS• se formó tras la reacción de 3.5 mM de ABTS con 1.25 mM de persulfato potásico (concentración final). Las muestras fueron incubadas entre 2-8 °C y en oscuridad durante 16-24 h. Una vez formado el radical ABTS se diluyó con etanol hasta obtener una absorbancia de  $0.7 \pm 0.05$  a 734 nm. A un volumen de 190  $\mu$ L de la dilución del radical ABTS• se le adicionaron 10  $\mu$ L de la muestra de AE y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos; luego de transcurrido este tiempo, se determinó espectrofotométricamente la desaparición del radical ABTS• a 734 nm en el lector de microplacas Multiskan Ex (Thermoscientific). Se utilizó ácido ascórbico (4  $\mu$ g/mL) como control positivo de captación de los radicales ABTS•. La IC<sub>50</sub> fue determinada evaluando las concentraciones seriadas de la muestra mediante análisis de regresión lineal. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  E.S.M del porcentaje de captación del radical ABTS• relativo al grupo control. Las diferencias frente a la solución estándar de DPPH se determinaron mediante ANOVA, los valores de  $P < 0,05$  se consideraron significativos.

### 3.3.3 Método ORAC

**a) ORAC hidrofílico:** en esta evaluación se empleó trolox como estándar y condiciones controladas de temperatura (37°C) y pH (7.4). Las lecturas se realizaron a una  $\lambda$  de excitación de 493 nm y de emisión de 515 nm. Para el desarrollo de la técnica se utilizaron soluciones de fluoresceína  $1 \times 10^{-2}$  M en PBS (75 mM) y AAPH 0.6 M en PBS (75 mM). La muestra se preparó mezclando 21  $\mu$ L de fluoresceína, 2.899  $\mu$ L de PBS, 30  $\mu$ L del extracto (muestra problema) y 50  $\mu$ L de AAPH. Como referencia se usó trolox. El efecto protector del antioxidante se calculo usando las diferencias de áreas bajo la curva de decaimiento de la fluoresceína con el blanco y la muestra, y el resultado se comparó con la curva obtenida para el trolox. Los resultados se expresaron en micromoles de equivalentes de Trolox por cada 100 gramos de muestra ( $\mu$ mol Tx/100 g muestra), de acuerdo a la siguiente ecuación (4).

$$ORAC = \frac{(AUC - AUC^{\circ})}{(AUC_{Trolox} - AUC^{\circ})} f[Trolox] \quad \text{(Ecuación 4)}$$

Donde AUC es el área bajo la curva de la muestra,  $AUC^{\circ}$  es el área bajo la curva para el control,  $AUC_{Trolox}$  área bajo la curva para el trolox,  $f$  es el factor de dilución de los extractos.

**b) ORAC lipofílico:** se siguió el procedimiento previamente descrito a excepción de que la muestra y el trolox fueron preparados con ciclodextrina metilada (7%) y en una mezcla de acetona-agua al 50%. Las disoluciones se agitaron durante 1 hora y se procedió al análisis de acuerdo con lo descrito en el método ORAC hidrofílico.

### 3.3.4 Empleo del AE como preservante de la oxidación de una matriz alimentaria lipídica

Se empleó como matriz alimentaria el aceite de palma crudo suministrado por la empresa Extractora De Aceite Hacienda Las Flores, al cual se le realizaron los análisis descritos a continuación.

- **Índice de Acidez**

El índice de acidez se define como los mg de NaOH o KOH necesarios para neutralizar los ácidos grasos libres presentes en un gramo de aceite o grasa y es una medida de su grado de hidrólisis. La causa de la existencia de ácidos grasos libres es la actividad enzimática de las lipasas. Se pesaron 2.0 g de aceite y se disolvieron en 50 mL de etanol; la mezcla se calentó hasta ebullición, se enfrió y se adicionó fenolftaleína (1%) como indicador. La titulación se llevó a cabo con solución alcalina de NaOH 0.1 M hasta alcanzar el viraje a un color rosa tenue permanente (30 s). Se registró el volumen de hidróxido de sodio consumido y se calculó la acidez, de acuerdo a la ecuación 5:

$$\%Acidez = \frac{PM \cdot V \cdot N}{10 w} \text{ (Ecuación 5)}$$

Dónde:

**PM:** peso molecular del ácido graso principal del aceite. (g/mol).

**V:** volumen gastado de Hidróxido de Sodio en mililitros. (mL)

**N:** concentración del Hidróxido de Sodio. (NaOH)

**w:** peso de la muestra de aceite, en gramos. (g)

- **Densidad**

La densidad de una muestra de aceite es importante determinarla con el fin de proyectar el diseño de almacenamiento y su procesamiento. Se pesó un picnómetro de 10 mL, previamente lavado y seco, se llenó con agua y se colocó en un baño termostático (Mettler) a temperatura constante de 25 °C; posteriormente, se pesó, se secó a una temperatura de 100 °C por una hora, se dejó

enfriar y se llenó con la muestra. Luego, se colocó en el baño termostático a 25 °C durante 30 minutos; finalmente, se registró el peso y se realizaron los cálculos de acuerdo con la ecuación 6.

$$\text{Densidad } \rho \text{ (g/mL)} = \frac{[(\text{peso del picnómetro} + \text{muestra}) - (\text{peso del picnómetro})] \text{ (g)}}{\text{Volumen del aceite (mL)}} \quad (\text{Ecuación 6})$$

- **Índice de peróxido**

El índice de peróxido es un buen indicador de la calidad del aceite. También es un parámetro que indica el grado de frescura de los aceites almacenados. En un erlenmeyer de 250 mL se pesó una muestra de 5.0 gramos de aceite crudo de palma, se adicionaron 30 mL de una solución de ácido acético – cloroformo (3:2) y se agitó hasta disolución. Seguidamente, se agregaron 0.5 mL de una solución saturada de yoduro de potasio (KI), se agitó y se dejó en reposo por un minuto; posteriormente, se adicionó 30 mL de agua. La mezcla se valoró lentamente con tiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) 0.1N, agitando enérgicamente hasta casi la desaparición del color amarillo. En este punto se adicionaron 0.5 mL de una solución de almidón al 1% y se continuó titulando hasta la desaparición del color azul. El índice de peróxidos (IP), expresado en miliequivalentes de oxígeno activo por kg de grasa, se calculó mediante la ecuación (7)

$$\text{IP} = \frac{V \ N \ 1000}{P} \quad (\text{Ecuación 7})$$

Dónde:

**V:** volumen de solución de tiosulfato sódico.

**N:** normalidad de la solución de tiosulfato sódico.

**P:** peso en gramos de la muestra problema.

- **Índice de yodo (IY)**

El índice de yodo de un aceite es una medida del contenido de enlaces dobles o insaturaciones capaces de reaccionar con el halógeno. El IY está relacionado con el punto de fusión o dureza y densidad de la materia grasa.

En un frasco adaptado para determinación de índice de iodo se pesó 0.1 gramos del aceite crudo de palma, al cual se le adicionaron 25 mL de solución de Hanus al 0.1N; posteriormente, se colocó el frasco de iodo al abrigo de la luz por 30 minutos, al culminar este tiempo se adicionaron 10 mL de solución de KI al 15% y 10 mL de agua. Luego, se valoró con la disolución de tiosulfato sódico hasta que desapareció casi totalmente el color amarillo producido por el yodo. Inmediatamente, se adicionaron 5 gotas solución de almidón al 1% y se continuó la valoración hasta el momento en que desapareció el color azul, los cálculos se realizaron con la ecuación 8:

$$\text{Índice de Iodo} = \frac{12,69 \text{ c (V1 - V2)}}{P} \quad \text{(Ecuación 8)}$$

Dónde:

**c**: concentración de la solución de tiosulfato sódico, expresada en moles por litro.

**V<sub>1</sub>**: volumen de la solución de tiosulfato sódico utilizado para el blanco, expresado en mililitros.

**V<sub>2</sub>**: volumen de la solución de tiosulfato sódico utilizado para la determinación, expresado en mililitros.

**p**: peso de la muestra problema, expresado en gramos.

- **Índice de saponificación**

Se define como el número de mg de KOH necesarios para saponificar 1 g de grasa. Para esta determinación se pesaron en un matraz de 250 mL 2.0 g de muestra se adicionaron 50 mL de solución de KOH alcohólica 0.5 N, se adaptó al matraz un condensador para reflujo y se dejó en ebullición moderada por 60 minutos. Después de enfriar, se adicionaron 50 mL de agua destilada y 4 gotas de fenolftaleína al 1%, se valoró con ácido clorhídrico 0.5 N. Paralelamente, se

determinó el valor de un blanco operando en las mismas condiciones pero sin la muestra, los cálculos se realizaron con la ecuación 9:

$$\text{Índice Saponificación} = \frac{(V_1 - V_2) \times 0.5N \times 56.1}{P} \quad (\text{Ecuación 9})$$

Dónde:

**V<sub>1</sub>**: Volumen de HCl utilizado (mL) en el blanco.

**V<sub>2</sub>**: Volumen de HCl utilizado (mL) en la muestra.

**P**: Peso de la muestra en gramos.

- **Índice de TBA o sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.**

En un matraz de 50 mL se pesaron 0.1 g de muestra, se adicionaron 5 mL de 1 – butanol y 5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA); la mezcla se colocó en un baño termostático (Mermert) a 95 °C por 2 horas. Posteriormente, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Spectronec 21) a una longitud de onda de 530 nm usando agua destilada como referencia; el cálculo se realizó con la ecuación 10, los resultados se expresaron como unidades de absorbancia por gramo de muestra (Ab /g).

$$\text{Índice TBA} = \frac{[50 \times (A-B)]}{M} \quad (\text{Ecuación 10})$$

Dónde:

**A**: Absorbancia de la muestra.

**B**: Absorbancia del blanco.

**50**: Factor aplicado si el matraz utilizado es de 25 mL y el ancho de las celdas de 10 mm.

**M**: masa de la muestra en gramos

- **Oxidación térmica del aceite de palma.**

La auto-oxidación térmica del aceite de palma crudo se realizó en un horno (Mermmet) a una temperatura constante de 63 ± 1°C durante 18 días. En un tubo Falcon de 25 mL sin tapa, se adicionaron 10 mL de aceite crudo de palma, se realizaron diluciones seriadas de 150, 250, 350,

450 y 600 ppm de los AE en la matriz de aceite y se colocaron en el horno. Para el análisis, se tomaron muestras cada 3 días por triplicado. Como control negativo se utilizó el aceite crudo de palma sin adición de antioxidantes y como control positivo se utilizó aceite crudo de palma con ácido ascórbico. En cada muestra se determinó el índice de TBA.

#### **3.3.4. Análisis de Resultados**

Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  DE (desviación estándar). Las diferencias significativas se determinaron mediante el análisis con el Test de student o de ANOVA seguido del test de Dunnett o de Tukey, o según el caso. \*\*  $p < 0,01$  y \*  $p < 0,05$  comparado con el control.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1 RENDIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL Y PROPIEDADES FÍSICAS

Los AE de las tres especies vegetales presentaron propiedades físicas comunes: olor intenso y característico, líquidos a temperatura ambiente, arrastrables por vapor de agua, insolubles en agua y el rango de color va desde amarillo pálido a intenso; estas características son similares a las reportadas para AE provenientes de estas plantas (Bandoni, 2002).

**Tabla 5.** Rendimiento y propiedades físicas de los AE de las especies seleccionadas, aplicando el método de hidrodestilación por arrastre de vapor (HD) e hidrodestilación asistida por microondas (HDM)

ANÁLISIS	<i>Orégano (Origanum vulgare)</i>		<i>Orégano Borde Blanco (Origanum vulgare ssp)</i>		<i>Oreganito (Lippia alba Mill)</i>	
	HD	HDM	HD	HDM	HD	HDM
Rendimiento (%)	0.0903±0.0005 8 a	0.0700±0.00 600 b	0.0510±0.000 c	0.0426±0.0005 5 d	0.1557±0.00058 e	0.1002±0.1002 f
Índice de refracción 20°C	1.4766±0.0000 2 a	1.5030±0.00 10 b	1.4753±0.0004 a	1.5065±0.0004 7 c	1.4617±0.0001 d	1.5023±0.00026 b
Solubilidad EtOH (70% v/v)	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
Rotación óptica	-0.200±0.000 a	-0.200±0.000 a	-0.283±0.0288 b	-0.267±0.02886 b	-0.117±0.02886 c	-0.133±0.02886 d
Densidad (g/mL) a 20°C	0.9259±0.0036 8 a	0.9539±0.00 026 b	0.9471±0.0052 3 b	0.9473±0.0043 1 b	0.9454±0.00506 b	0.9449±0.00871 b

Filas sin ninguna letra en común presentaron diferencias estadísticas significativas a un nivel de confianza (< 0.05)

En la Tabla 5 se muestra el rendimiento obtenido en la extracción y las propiedades físicas de los AE, de cada una de las tres especies vegetales analizadas, obtenidos por el método de hidrodestilación por arrastre de vapor (HD) e hidrodestilación asistida por microondas, (HDM).

La extracción mediante HDM presentó rendimientos que fluctúan entre 0.043 a 0.1%, y por el método HD los valores encontrados están en el rango comprendido entre 0.051 a 0.156%; lo anterior



es acorde con lo reportado en la literatura para *Lippia alba* mil, con valores que fluctúan entre el 0.1 a 1.2% del aceite volátil (Pascual, 2001); de igual manera, Monsalve (2007) obtuvo un rendimiento para el AE de *Lippia alba* del 0,06% extraído por HD. Adicionalmente, los valores obtenidos fueron inferiores a los reportados por otros autores. Albado, *et al.* (2001), determinaron el rendimiento del AE de *Origanum vulgare* extraído por HD, reportando un rendimiento de 1.3 %. Por su parte, Kulisic *et al.* (2004) obtuvieron aceite de orégano o mediante hidrodestilación en un rendimiento del 2,9%. En el estudio realizado por Dos Santos *et al.* (2004) obtuvieron un rendimiento de 4,6% (p/p) para *L. organoides* en tres localidades del Brasil. En otra especie del mismo género *Lippia*, se encontraron rendimientos del 4,3% (Rocha *et al.*, 2007), mientras que Acevedo *et al.* (2007) obtuvieron un rendimiento más bajo (2,3%) cuando emplearon el método de hidrodestilación asistida por radiación de microondas. En la investigación realizada por Escobar *et al.* (2010) en *L. organoides* colectada en el departamento del Cauca, Mercaderes y otros, obtuvieron un rendimiento del 2%. Igualmente, en otros quimiotipos de *L. organoides* colectadas a una altura de 850 m.s.n.m), se encontraron rendimientos que fluctuaron entre el 2,4 y el 3,1%, con variaciones dependientes del sitio de cultivo (Stashenko *et al.*, 2010).

Los rendimientos de los AE obtenidos fueron ligeramente más bajos que los reportados en la literatura y esto puede atribuirse, tal vez, a la técnica de extracción empleada. De acuerdo con Mosalve (2007), la técnica HDM es más efectiva en la extracción de los metabolitos secundarios volátiles que la HD; por contraparte, esta técnica presenta algunas ventajas destacables en cuanto a la disminución del tiempo de proceso y de la cantidad de agua requerida, igualmente hay mejoría en la cantidad de calentamiento efectivo requerido y el tamaño del equipo es reducido.

Con respecto al rendimiento se encontraron diferencias estadísticas significativas por ambos métodos; cabe resaltar que la primera técnica, además de utilizar menos tiempo de extracción, mostró un porcentaje de rendimiento menor que el valor obtenido por el método de HD, esto posiblemente puede atribuirse al deterioro estructural de algunos componentes abundantes en el aceite esencial causados por las radiaciones electromagnéticas aplicadas en la extracción; las microondas involucran un flujo de calor más eficiente que el obtenido por los métodos clásicos de calentamiento conductivo, las microondas pueden calentar toda la muestra casi simultáneamente y a un ritmo muy alto, generando un menor consumo de energía por el método de hidrodestilación

asistido por microondas que por el método de Hidrodestilación. (Golmakani y Rezaei, 2007). Es importante resaltar que las comparaciones se realizaron para plantas cultivadas a diferentes condiciones, parcelas y tiempos de cortes, siendo estas otras variables a diferencia del método de extracción que influenciaron en el proceso, todo esto se debió a las dificultades para adquirir el material vegetal en las etapas del muestreo.

También existen otros factores que probablemente pudieron influir sobre el rendimiento de los AE como son: los métodos de cultivo y las condiciones geobotánicas: clima, altitud, tipo de suelo, luminosidad, pluviosidad, temperatura; método de extracción del aceite, época de recolección y edad de las plantas (Stashenko, *et al.*, 2010).

Con respecto al índice de refracción, los resultados obtenidos presentaron diferencias estadísticas significativas para los dos métodos de extracción. Los AE obtenidos HD presentaron valores mínimos y máximos de 1.4617 y 1.4766, mientras que por HDM fueron de 1.5023 y 1.5065, respectivamente. Flórez (2007), reportó para el AE de *Lippia graveolens* obtenido por el método de HD valores entre 1.499 y 1.508. Tomando en cuenta que este parámetro es exclusivo de cada AE, es muy importante su determinación debido a que su valor cambia si el AE se diluye o mezcla con otras sustancias; y por lo tanto; es una medida de la calidad y un parámetro que ayuda a controlar la adulteración (Ortuño, 2006).

En el análisis estadístico de los valores de densidad no se observaron diferencias estadísticas significativas, a excepción del valor obtenido por el método de HD para el *Origanum vulgare* con un valor de 0.925 g/mL. Estos valores son similares a los reportados por Mendoza (2008) y Corral (2008). La semejanza en los resultados fortalece lo dicho por Mendoza sobre la densidad como un parámetro de aceptación para los AE de orégano. Según lo reportado en la literatura, los AE con índices de refracción mayores a 1.47 y densidades superiores a 0.9 g/mL tienen en su composición cantidades importantes de compuestos oxigenados aromáticos o alicíclicos (Granados *et al.*, 2012). Estos datos corresponden a los valores determinados experimentalmente para todos los AE extraídos por los dos métodos mencionados.

La actividad óptica es una magnitud específica de cada aceite y su magnitud garantiza que el AE no está mezclado con otros productos; sin embargo, este es un parámetro variable que cambia de un año a otro. Por lo tanto, una diferencia alta entre valores no siempre está implicada con una adulteración del producto; se debe prestar especial atención a cada etapa del proceso de extracción, ya que alguna de ellas puede afectar la magnitud final del parámetro y hacer que se pierda la calidad (Mendoza 2008).

La prueba de solubilidad en etanol al 70% fue positiva para los diferentes AE de oréganos obtenidos por los métodos de HD y HDM. El comportamiento de solubilidad es semejante al reportado por Mendoza (2008); lo anterior, se debe principalmente al contenido de compuestos oxigenados en los AE. La presencia de compuestos oxigenados aumenta la afinidad por el solvente y, adicionalmente, los aldehídos y alcoholes poseen la capacidad de formar puentes de hidrógeno; por tal razón, el contenido de compuestos oxigenados, además de proveer las notas aromáticas agradables a los AE, aumentan su solubilidad en etanol haciéndolos más aptos para su aplicación en la industria.

#### 4.2 PERFIL QUIMICO DE LOS COMPONENTES MAYORITARIOS DE LOS AE OBTENIDOS POR LOS MÉTODOS DE HIDRODESTILACIÓN POR ARRASTRE DE VAPOR E HIDRODESTILACION ASISTIDA POR MICROONDAS

En la Tabla 6 se presentan los componentes mayoritarios presentes en los AE obtenidos por los métodos de hidrodestilación por arrastre de vapor e hidrodestilación asistida por microondas.

**Tabla 6. Análisis de los componentes mayoritarios presentes en los AE obtenidos mediante hidrodestilación por arrastre con vapor e hidrodestilación asistida por microondas.**

Compuesto	Orégano ( <i>Orégano vulgare</i> )		Orégano borde blanca ( <i>Orégano vulgare ssp</i> )		Oreganito ( <i>Lippia alba mill</i> )	
	% Abundancia relativa , (t <sub>R</sub> , min)					
	HD	HDM	HD	HDM	HD	HDM
<b>p-Cimeno</b>	N.P	8.51 (5.912)	N.P	2.31 (5.957)	N.P	5.50 (6.198)
<b>α-pineno</b>	N.P	N.P	0.59 (9.957)	N.P	N.P	0,29 (4.217)
<b>β-Mirceno</b>	N.P	0.40 (5.173)	N.P	N.P	1.04 (12.103)	0.71 (5.173)

<b>o-cimeno</b>	N.P	N.P	6.71 (13.464)	N.P	3.05 (13.438)	12.17 (5.942)
<b>Limoneno</b>	N.P	N.P	N.P	N.P	0.55 (13.508)	N.P
<b>γ –Terpineno</b>	9.81 (14.691)	13.43 (6.545)	6.25 (14.709)	0.91 (6.485)	1.49 (14.479)	12.07 (6.575)
<b>Linalool</b>	N.P	N.P	N.P	N.P	0.42 (15.896)	N.P
<b>Timol</b>	<u>13.77</u> (22.764)	N.P	10.11 (22.148)	10.74 (20.854)	N.P	N.P
<b>Citral</b>	N.P	N.P	N.P	6.49 (10.102)	5.24 (20.522)	N.P
<b>Carvacrol</b>	65.63 (11.852)	65.01 (11.360)	64.55 (22.521)	<u>69.97</u> (11.684)	0.14 (22.616)	44.74 (11.383)
<b>Eugenol</b>	N.P	N.P	N.P	N.P	N.P	5.21 (12.679)
<b>Cariofileno</b>	7.49 (25.248)	N.P	4.00 (25.361)	2.75 (12.58)	N.P	4.38 (12.762)
<b>Fenil isoprenos</b>	82,11%	74,52%	80,97%	<u>86,63%</u>	1,17%	52,59%
<b>Monoterpenos</b>	10,14%	25,58%	14,69%	10,42%	<u>98,83%</u>	42,26%
<b>Sesquiterpenos</b>	<u>7,75%</u>	0%	4,34%	2,95%	0%	5,15%
<b>Otros</b>	0%	0%	0%	0%	0%	0%
<b>Total compuestos identificados</b>	<b>96,7%</b>	<b>87,35%</b>	<b>92,21%</b>	<b>93,17%</b>	<b>11,93%</b>	<b>85,07%</b>

NP= No presente en la muestra

El aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) obtenido por HD presentó los siguientes compuestos mayoritarios: carvacrol (65.63%), timol (13,7%), γ-terpineno (9,81%) y cariofileno (7,49%). Estos compuestos también se encontraron en los AE de orégano estudiados por Puertas (2002), Salgar (2002) y Tafurt *et al.* (2005); por el método de HDM se identificaron principalmente dos grupos de compuestos: fenilpropanoides, constituidos por carvacrol; e hidrocarburos monoterpénicos, entre los que se destacan, *p*-Cimeno, β-mirceno y α-terpineno. (Anexos 2 y 3).

El AE de *Origanum vulgare* (orégano) obtenido por HDM mostró una menor cantidad de hidrocarburos monoterpénicos, en contraste con el AE de orégano extraído por el método de HD. Esto puede ser debido muy posiblemente a una baja eficiencia de la extracción. Otro factor que pudo jugar un papel importante durante la extracción mediante esta técnica, es el contenido de compuestos grasos (lípidos) presentes en la planta, ya que son poco volátiles y en cierto modo llegarían a retener por solubilidad a la fracción de hidrocarburos volátiles que muestran más afinidad por ellos (Granados *et al.*, 2012). Adicionalmente, se evidenció que cada método de extracción tiene

una afinidad especial por determinadas familias o grupos de compuestos, tal como lo expresan Mendivelso y Olivares (2007) en su trabajo sobre AE de geranio.

En el AE de *Lippia alba mill* (oreganito) obtenido por el método de HD se obtuvo un 5,24% de al  $\beta$ -Citral, seguido de o-cimeno (3,05%),  $\gamma$ -terpineno (1,49%),  $\beta$ -mirceno (1,40%),  $\alpha$ -citral (1,47%), limoneno (0,55%) y carvacrol (0,14%). Se destaca la composición del AE obtenido de las hojas de *Lippia alba mill* (oreganito) por el método de HD que es notoriamente diferente con respecto a la composición del obtenido por el método de HDM; en éste último predomina el carvacrol con un 44,74%, seguido del  $\gamma$ -terpineno (12,07%), eugenol (5,21%) y el cariofileno (4,38%) (Anexo 2). En otros estudios donde utilizan los métodos de HD convencional e hidrodestilación asistida por microondas (HDM), reportan que la cantidad de compuestos del tipo de los fenilpropanoides es mayor cuando se utiliza HDM (Golmakani y Rezaei, 2008; Bousbia, *et al.*, 2009).

Con respecto a la composición del AE de *Origanum vulgare* (orégano borde blanco) obtenido por el método de HDM, donde predominaron los compuestos carvacrol con un 69,70% y timol con un 10,74%, el  $\gamma$ -terpineno es un monoterpeno cíclico precursor biosintético del timol y del carvacrol. El AE obtenido por el método de HD mostró una composición de carvacrol del 64,55% y de timol 10,11%.

Lagouri y Boskou (1993), Castillo *et al.* (2007) y Loziene *et al.* (2007) encontraron que la oxidación de los AE de orégano es dependiente del contenido de timol y carvacrol. Por su parte, el grupo de Yanishlieva y Marinova (1999) informa sobre algunos aspectos del mecanismo y la cinética de la oxidación de diferentes sistemas lipídicos inhibidos por la presencia timol y carvacrol, hallando mayor efectividad del timol, debido a la mayor estabilidad del radical timoil, originada por el efecto inductivo del grupo isopropil localizado en la posición orto con relación al O-H.

Al comparar los AE de *Origanum vulgare* (orégano borde blanco) obtenidos por los dos métodos de extracción, se observó que el AE extraído mediante el método HDM contiene citral en un 6,49%, conformado por una mezcla de los compuestos isoméricos, geranial, y neral. Los compuestos carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados, son de especial importancia en la síntesis orgánica debido a su aplicación como intermediarios en la producción de alcoholes a escala industrial, estos materiales

son explotados principalmente por las industrias de aromas, fragancias y medicamentos; el citral en particular es empleado en la síntesis de vitamina C.

Es importante resaltar que todos los AE obtenidos por los dos métodos de extracción poseen carvacrol, y este componente está asociado fundamentalmente con la actividad antioxidante (Chen, *et al.*, 2009).

Las condiciones agroecológicas del cultivo y los parámetros operacionales del proceso de extracción son variables que inciden sobre la composición y el rendimiento de los AE. Bandoni (2000) y Tafurt *et al.* (2005), indican que las variaciones en las condiciones agroecológicas inducen cambios morfológicos, histológicos y fisiológicos en la planta, mientras que la eficiencia de la HD está relacionada con los parámetros operacionales, tales como tiempo, temperatura de la extracción y cantidad de agua empleada, entre otros. Los AE obtenidos mediante HD normalmente presentan notas más fuertes y un color más oscuro con respecto a los producidos por otros métodos.

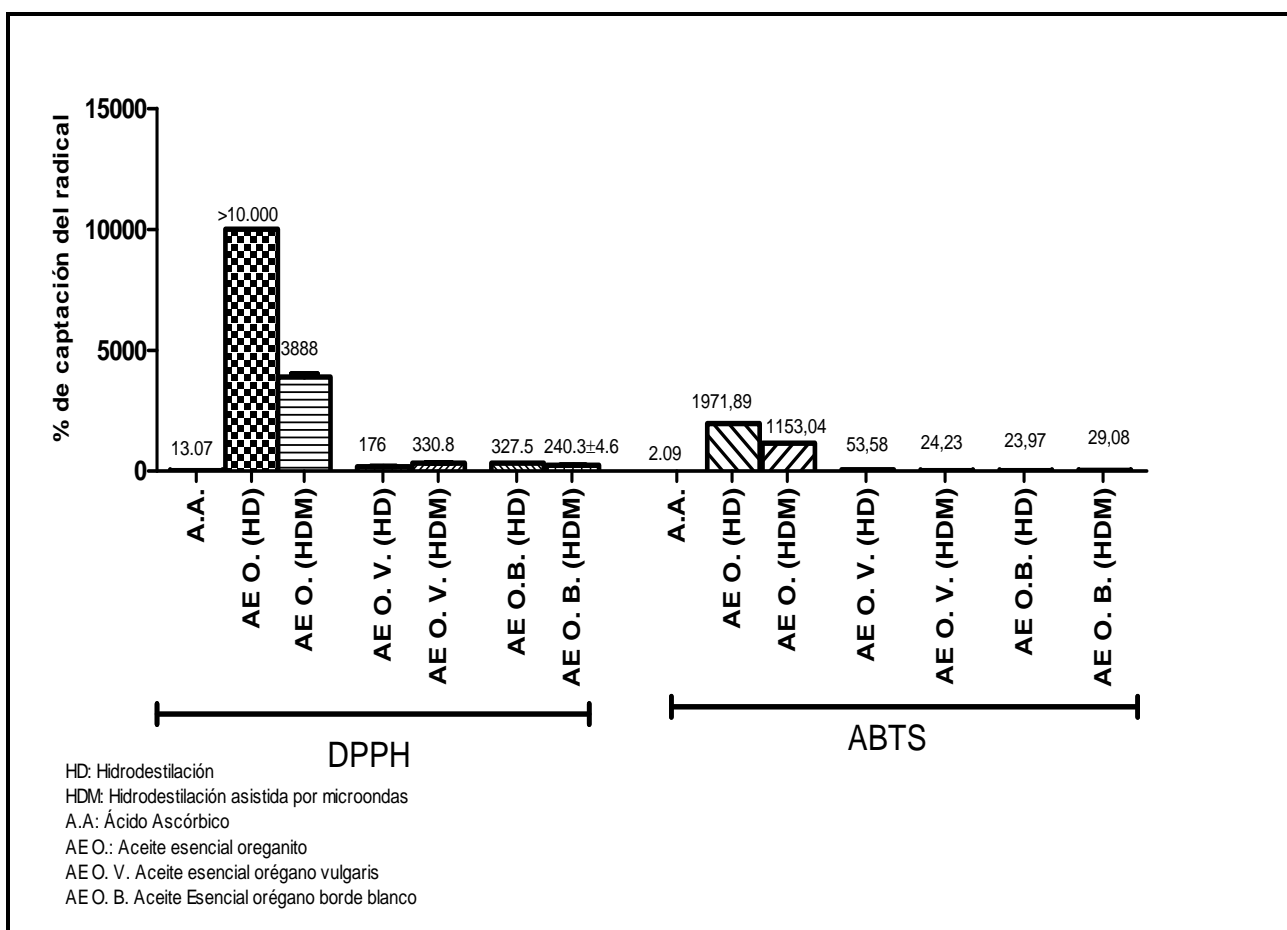
#### **4.3 EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

La capacidad antioxidante evaluada *in vitro* puede usarse como un indicador indirecto de la actividad *in vivo*. La mayoría de los métodos para determinar la capacidad antioxidante consisten en acelerar el proceso de oxidación en la matriz alimentaria. La capacidad antioxidante de un producto alimenticio está determinada por las interacciones que ocurren entre los diferentes compuestos con diferentes mecanismos de acción, por este motivo la determinación de la capacidad antioxidante en extractos complejos se lleva a cabo usualmente por diferentes métodos complementarios, que consideran diversos mecanismos de acción (Floegel, *et al.*, 2011).

La actividad antioxidante de los AE de *Lippia alba* Mill (orégano), *Oréganum vulgare* (orégano) y *Oréganum vulgare ssp* (orégano borde blanco), se evaluó por tres métodos diferentes: DPPH<sup>•</sup>, ABTS y ORAC. Los antioxidantes pueden actuar por múltiples mecanismos, dependiendo del sistema de reacción o de la fuente radicalaria u oxidante utilizada (Prior, *et al.*, 2005). Los resultados se expresan como actividad antiradical o IC<sub>50</sub> (Concentración Eficaz 50), la cual está definida como la concentración del antioxidante que disminuye la absorción del radical a un 50% de la cantidad inicial. Existe una relación inversamente proporcional que indica que a mayor valor del IC<sub>50</sub> menor actividad antiradical (Floegel, *et al.*, 2011).

El valor IC<sub>50</sub> mide la capacidad captadora de radicales ABTS•+ o DPPH• de los AE con respecto a un estándar antioxidante como el ácido ascórbico, el cual cede un hidrógeno, produciéndose una transferencia de electrones de doble enlace, hacia el oxígeno, que sufrió la pérdida de un electrón, repitiendo la misma acción en el siguiente átomo de oxígeno, que sufrió la pérdida del átomo de hidrógeno, hasta establecerse el equilibrio de energía. De acuerdo a esta reacción, el ácido ascórbico cede dos hidrógenos (Villanueva et al., 2010).

En la Figuras 11 se presentan los resultados obtenidos en la determinación de la capacidad antioxidante total de las muestras provenientes de los AE extraídos por los métodos HD Y HDM analizadas por los métodos espectrofotométricos DPPH y ABTS, (Anexos 4 y 5).



IC<sub>50</sub>: corresponde al valor de la concentración de aceite esencial que estabiliza el 50% del radical libre. Valores menores indican mayor actividad antioxidante.

**Figura 11. Actividad antioxidante expresada como IC<sub>50</sub> de los AE evaluados por los métodos del DPPH y ABTS**

Los resultados de la actividad captadora de radicales DPPH• y ABTS•+ de los diferentes AE variaron entre 176 y 10000 µg/mL para el DPPH•, y de 23.97 a 1971.89 µg/mL para el ABTS•+ (Figura 11). De los tres AE que se estudiaron en este trabajo los más promisorios, debido a que mostraron actividad significativa cuando fueron obtenidos mediante HD y HDM, fueron el AE de *Oréganum vulgare* (orégano) y AE de *Oréganum vulgare ssp* (orégano borde blanco). Es posible inferir que cada técnica de extracción por sus condiciones de reacción y solubilidad propicie la existencia de diversos compuestos con potencial antioxidante en la mezcla.

Los resultados muestran que para todos los AE los valores obtenidos con el ABTS, y expresados como µg/mL, son menores que los obtenidos con la técnica del DPPH; el método de la decoloración del catión-radical ABTS•+ es aplicable a antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos lo que le permite ser implementado para sistemas tanto acuosos como lipofílicos (Re, 1999; Nenadis, 2004); además, el ABTS es muy soluble en agua y químicamente estable (Kukoski, 2004, Kukoski, 2005, Gonzales, 2007); en cambio, el DPPH solo puede disolverse en medio orgánico por lo que mide preferentemente la capacidad antioxidante de compuestos poco polares o no polares (Apak, *et al.*, 2007; Floegel, *et al.*, 2011).

La capacidad antioxidante de los AE obtenidos de las especies de orégano se atribuye a los compuestos activos presentes en ellos; es decir, la actividad se debe a los componentes principales, de tipo monoterpeno y aril propanoides como el carvacrol, el timol y otros tipos de fenoles; pero además, se puede atribuir a la presencia de constituyentes en pequeñas cantidades o a la sinergia que se puede presentar entre ellos, como se reporta generalmente en la literatura (Politeo, 2006), se debe tener en cuenta que en los análisis de cuantificación de la capacidad antioxidante el DPPH es más selectivo que el ABTS•+.

La mayor actividad captadora del radical DPPH• se registró en el AE proveniente de *Oréganum vulgare* (orégano) obtenido por el método de HD, seguido de *oréganum vulgare ssp* (orégano borde blanco) obtenido por el método de HDM, mientras que en los análisis realizados con el radical ABTS•+ el orden se invierte. Para los análisis realizados con ABTS, el AE de *Oréganum vulgare ssp* (orégano borde blanco) obtenido por el método de HDM y el AE de *Oréganum vulgare* (orégano), obtenido por el método de HD presentaron una actividad similar a la observada con el ácido



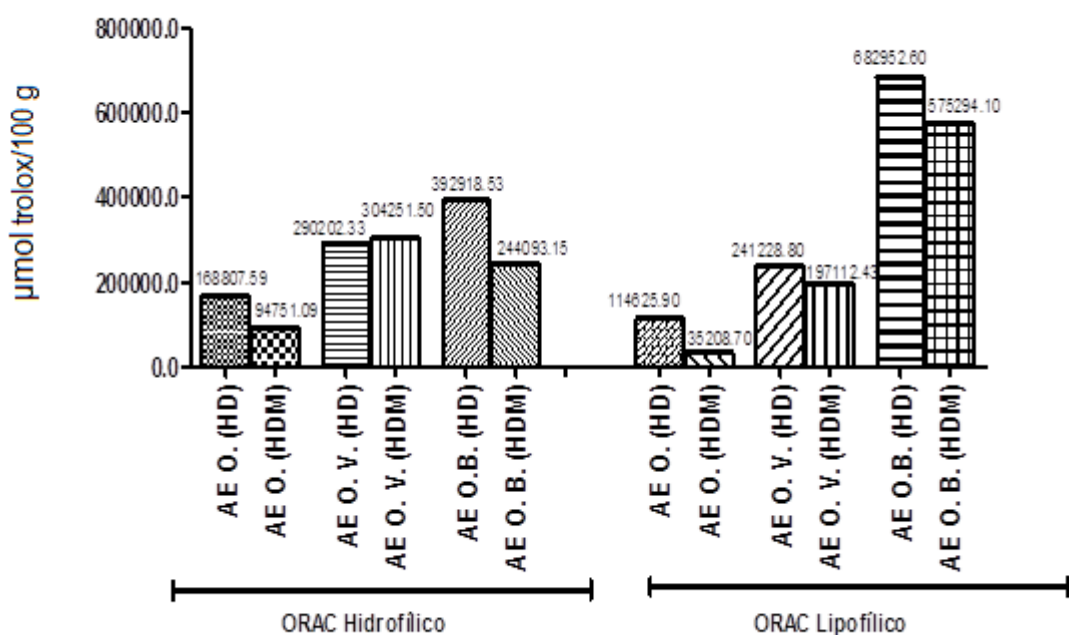
ascórbico. De otro lado, el AE obtenido de *Lippia alba mill* (oreganito), exhibió actividad captadora de radicales muy débil en ambos métodos, y el AE de *Lippia alba mill* obtenido por HDM presentó una mayor actividad captadora del radical ABTS•+ con respecto al AE obtenido por HD. Para el radical DPPH•, la mayor actividad captadora se registró en el AE obtenido desde *Lippia alba mill* por HDM, la actividad captadora de radicales por parte del AE de *Lippia alba mill* obtenido por HD fue >10000 (µg/mL). En los AE se encontraron diferencias en la capacidad captadora de radicales libres, lo anterior posiblemente es debido a que realmente se trata de dos especies diferentes provenientes de taxones distintos: el *Origanum vulgare* es una Lamiaceae y *Lippia alba mil* es una Verbenaceae, también conocidos como orégano europeo (*Origanum sp.*) y orégano Americano (*Lippia sp.*) (Kintzios, 2002; Mata-González y Meléndez-González, 2005). Algunas veces los resultados obtenidos de las evaluaciones realizadas por diferentes métodos no son comparables, debido a que algunos factores como la estructura física del sistema, la naturaleza del sustrato, la presencia de otros compuestos que pueden interactuar con el reactivo, la forma de iniciar la oxidación y el método utilizado para medir la oxidación pueden afectar la reproducibilidad y la magnitud de los resultados (Becker et al. 2004).

En las evaluaciones los AE presentaron un mayor valor de IC<sub>50</sub> con respecto a la sustancia control (ácido ascórbico). Aunque el AE de orégano variegado obtenido mediante HD alcanzó un valor de IC<sub>50</sub> = 176 y el orégano borde blanco obtenido por HDM un valor de IC<sub>50</sub> = 240.3, no se presentaron diferencias estadísticas significativas (P<0.005), y ambos AE presentaron una capacidad anti-radicalaria cercana o similar a la del ácido ascórbico.

La variabilidad en la actividad antioxidante exhibida por los AE de orégano obtenidos por HD y HDM, posiblemente se debe a que en la hidrodestilación cuando se lleva el agua hasta su punto de ebullición, mediante transferencia de calor, ella está en contacto directo con el material vegetal de tal forma que los vapores generados atraviesan los tejidos de la planta arrastrando las sustancias de interés; al aumentar la temperatura del medio, se rompen las estructuras celulares que contienen al aceite esencial por efecto de su presión de vapor. El aceite esencial es liberado y se disuelve parcialmente en el agua que actúa como disolvente, como un resultando el aceite pierde componentes oxigenados y se obtiene un AE de menor calidad. Igualmente, algunos componentes como los ésteres pueden experimentar hidrólisis y algunos hidrocarburos monoterpénicos,

especialmente los aldehídos, son susceptibles a la polimerización y los compuestos más oxigenados tienden a ser muy solubles en agua (Bandoni, 2002). A diferencia en el método de extracción HDM se presentan ventajas sobresalientes con respecto a las demás técnicas tradicionales de destilación; el proceso es muy rápido y relativamente económico y los AE obtenidos se encuentran libres de sustancias extrañas que disminuyan su calidad (Ferhat, *et al.*, 2006). Se debe tener en cuenta que el tiempo de hidrodestilación influye tanto sobre la cantidad de aceite obtenido o cantidad que se puede procesar en el tiempo, como en su composición y calidad (Stashenko, *et al.*, 2010)

La Capacidad atrapadora de especies reactivas del oxígeno en equivalentes trolox se muestra en la Figura 12, los datos se adjuntan en el anexo 3 y 4.



**Figura 12. Actividad antioxidante de los AE determinada por el método ORAC Hidrofílico y Lipofílico.**

La mayor actividad antioxidante se obtuvo para el AE de *Oréganum vulgare ssp* (orégano borde blanco) obtenido por HD. El valor ORAC lipofílico e hidrofílico fue de 682952.60 y 392918.53 μmol

trolox/100 g de muestra, respectivamente. El resultado anterior demuestra que estos AE tienen una alta capacidad de inhibir la decoloración de la molécula de fluoresceína.

Lo anterior se puede explicar mediante el efecto protector que ejercen las sustancias antioxidantes presentes en los diferentes AE de orégano que actúan sobre el AAPH (2, 2-azobis (2 amidino-propano) dihidrocloruro), generador de radicales peroxilo o radicales hidroxilos haciendo que atenúe la generación de estas especies con lo cual el sustrato oxidable (fluoresceína) disminuye su fluorescencia y la magnitud de esta interferencia se puede detectar y se cuantifica como un valor en equivalentes de Trolox (Ou, *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2005).

La mayor actividad antioxidante del AE de *Origanum vulgare ssp* (orégano borde blanco) se obtuvo por el método ORAC lipofílico, obteniéndose el menor valor de decoloración que representa la mayor actividad antioxidante con un valor de 682952.60  $\mu\text{mol trolox}/100\text{ g}$  de muestra, este valor supera los reportados en la literatura para muchas frutas, vegetales, aceites y legumbres (Rautenbach, 2010). Lo anterior indica la potencialidad que tienen los AE y en este caso el de *O. vulgare* para inhibir el proceso de enranciamiento de aceites comestibles.

#### **4.4 APLICACIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES A UNA MATRIZ ALIMENTARIA**

El aceite de palma ha sido uno de los renglones de mayor crecimiento en la industria agrícola colombiana. (Rincón, *et al.*; 2009). Para el desarrollo y optimización de sus procesos y productos es fundamental conocer las propiedades del aceite a partir de las cuales se puedan obtener resultados confiables. Para determinar la calidad del aceite crudo de palma se evaluaron tres parámetros directamente en los laboratorios de la planta extractora de Aceite Hacienda las Flores de María la baja S.A, empresa que muy gentilmente suministró el aceite crudo de palma con el cual se conformó la matriz alimenticia que se evaluó en el proyecto.

En la Tabla 7 se muestra el contenido de ácidos grasos libres (2,49 % AGL) del aceite crudo de palma; este valor indica que se trata de un aceite de muy buena calidad, que proviene de frutos sanos y que las condiciones de procesamiento fueron óptimas; el valor máximo permitido de %AGL es del 3% de acuerdo a la norma NTC 218. El porcentaje de humedad e impurezas encontrado en los análisis fue de 0.16 y 0.028%, respectivamente, estos valores se encuentran dentro de los

parámetros de calidad establecidos por la normatividad vigente de acuerdo con lo indicado en la norma técnica colombiana NTC 287, y la norma del Codex para aceites vegetales especificados Codex stan 210-1999.

**Tabla 7. Control de calidad realizado al aceite crudo de palma en la planta extractora de Aceite de María la Baja S.A**

PARAMETRO	VALOR
AGL (Expresado como % de Acido Palmítico)	2,49
Humedad (%)	0,16
Impurezas (%)	0,028
pH	6,06

Fuente: Laboratorio Planta extractora María la baja 2013

En la Tabla 8 se muestran los resultados de los análisis fisicoquímicos realizados al aceite crudo de palma.

**Tabla 8. Análisis fisicoquímico realizado al aceite crudo de palma suministrado por la empresa extractora de Aceite de María la baja S.A**

PARAMETROS	PROMEDIO ± DE	COEFICIENTE DE VARIACION (CV)	ESM	NORMAS	NTC
Densidad ( g/cc) a 25 °C	0.913±0.004	0.465	0.003	AOAC 940.28/90	0.868 – 0.876 431-2000-06-21
Índice de refracción a 25 °C	1.463±0.000	0.019	0.000	AOAC 919.28/90	1.459-1.455 431-2000-06-21
% acidez (expresado como ácido palmítico)	0.23±0.021	12	0.15	AOAC 940.28/90	Máx. 5 431-2000-06-21
Índice de peróxido, (meq O <sub>2</sub> /kg aceite)	0.230±0.028	12.298	0.028	AOAC 965.33/90	0.094 – 1.973 ISO 3960: 2001
Índice de Yodo,(mg I <sub>2</sub> /100 g aceite)	51.95±0.028	1.363	0.065	AOAC 940.150/90	50 - 58 431-2000-06-21
Índice de saponificación( mg KOH/g aceite)	247.30±1.690	0.683	1.195	NTC 355	195 - 205 431-2000-06-21 239 A 257 Resol. 000126/22/02/64
Índice de TBA (mg malonaldehído/100 g aceite)	< 0,05±0.000	0.000	0.000	AOACS 19.90	0.3

De acuerdo con los resultados de la Tabla 8, los valores de acidez (0.23% de ácido palmítico), Índice de Yodo (52.95 mg I<sub>2</sub>/100 g aceite), Índice de saponificación (247.3 mg KOH/g aceite) e Índice de TBA (<0.05 mg malonaldehído/100 g aceite) se encuentran de acuerdo con los parámetros de calidad establecidos en la norma NTC 431 de 2009; mientras que el Índice de peróxido está acorde con los valores de referencia propuestos por algunos autores (Rincón y Martínez, 2010). El valor obtenido para la densidad (0.913±0.004 g/mL) fue superior al valor de densidad promedio (0,89 g/mL) correspondiente al aceite crudo de palma que se procesa en Colombia; según Rincón y Martínez (2010) y Gustone (2008), el valor de la densidad se atribuye a la presencia de impurezas presentes en la muestra analizada, posiblemente presencia de humedad que influye sobre esta propiedad física.

En los alimentos con alto contenido de lípidos la etapa más importante del proceso de peroxidaciones la formación y descomposición de los hidroperóxidos; debido a que en ella se generan una serie de compuestos oxidados como cetonas, aldehídos, entre otros compuestos como alcanos y alquenos de bajo peso molecular y alta volatilidad, que generan olores y sabores desagradables que determinan el valor sensorial del alimento; este proceso de deterioro es denominado rancidez oxidativa (Rodríguez, *et al.*, 2007). Los antioxidantes pueden retardar la rancidez, pero nunca la detienen porque la oxidación ocurre a bajas presiones de oxígeno y se hace inevitable a pesar del uso de todas las metodologías de conservación que se puedan emplear como frío, escaldado y empaque (Gaviria *et al.* 2009).

Otra forma muy común de seguir la oxidación de ácidos grasos es la medición de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs), que son productos secundarios de peroxidación lipídica y se usan ampliamente en la industria de alimentos, más relevante aún, en este caso particular, por el uso de técnicas espectrofluorimétricas que tienen una alta sensibilidad y especificidad (Zapata *et al.* 2013).

En la Figura 13, se muestran los cambios en el índice TBAR del aceite de palma crudo, conteniendo diferentes cantidades de AE obtenido por HD y HDM y almacenado a 63 °C durante 18 días. (Ver anexo 6).

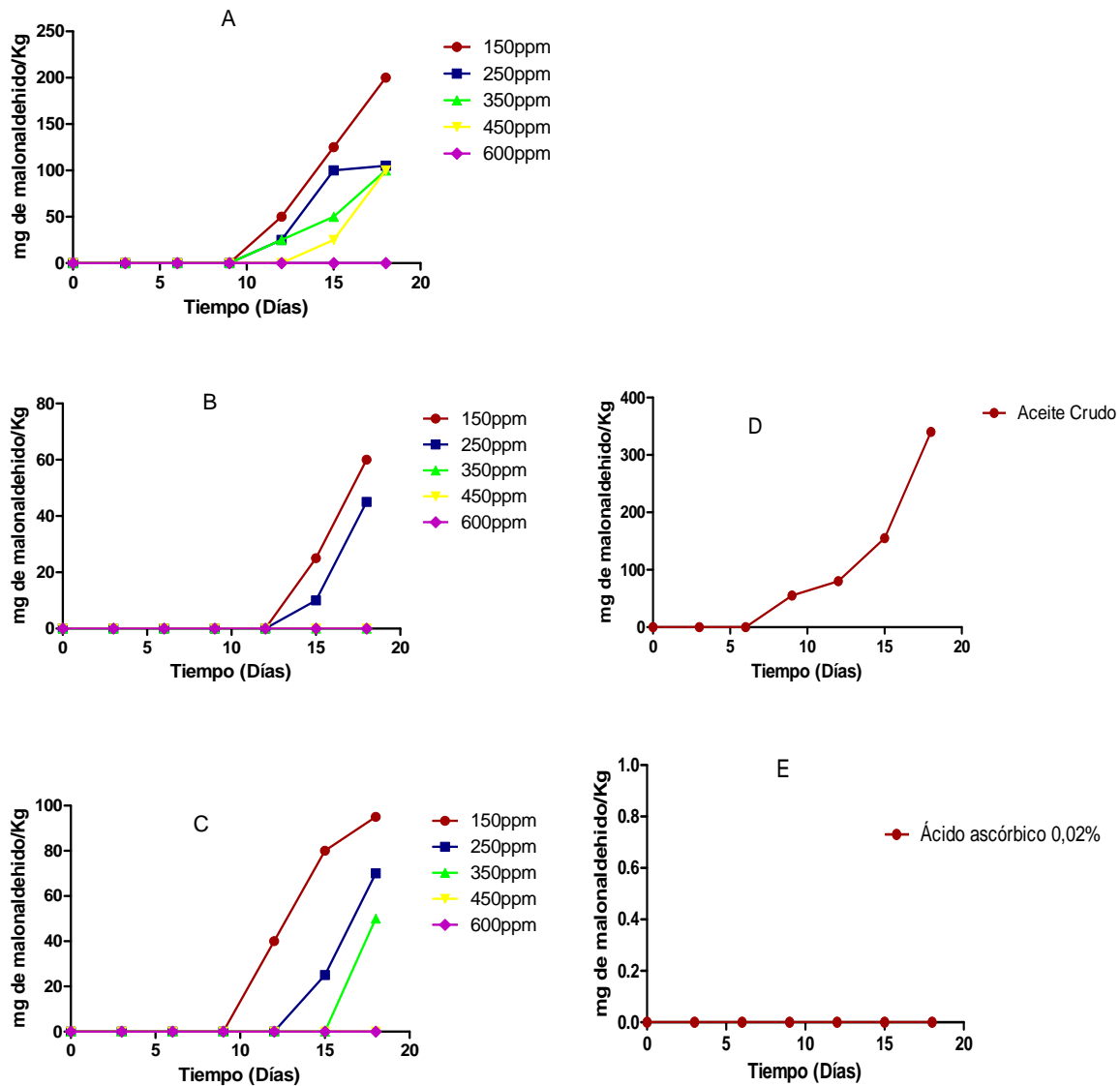


Figura 13. Cambios en el índice TBAR del aceite de palma crudo, conteniendo diferentes cantidades de AE obtenido por HD, almacenado a 63 °C durante 18 días. A: oreganito (*Lippia alba mill*); B: orégano (*Orégano vulgare*) C: Orégano borde blanca (*Orégano vulgare ssp*), D: aceite crudo sin aditivo; E: aceite crudo de palma con ácido ascórbico.

En la Figura 13 se muestra el efecto de las diferentes concentraciones de antioxidantes empleados en la evaluación. Se utilizó al ácido ascórbico como control al 0,02%, y se evaluaron las actividades antioxidantes de los AE de oreganito, orégano *Vulgare* y orégano borde blanco especialmente sobre inhibición de la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en las muestras de aceite crudo de palma en función del tiempo. Puede notarse que en el aceite crudo se presenta un incremento del contenido de TBARS a partir del día 6; interesantemente, los AE esenciales muestran la capacidad de inhibir el proceso oxidativo hasta el día 9 de almacenamiento; sin embargo, es dependiente de la concentración y la especie vegetal a partir de la cual se obtuvo el AE.

En la Figura 13E se observa que en el tratamiento del aceite crudo de palma con ácido ascórbico al 0,02% se obtuvo un valor TBARS = 0; este comportamiento se extendió durante todo el almacenamiento, desde el día cero hasta el día 18. Posiblemente, hay un efecto sinérgico que pueden brindar los tocoferoles que se encuentran en el aceite crudo de palma, que reducen en forma significativa los radicales tocoferoxilos (Makinen y Gutteridge 1994). Lo anterior puede sustentarse considerando los siguientes criterios:

De acuerdo a Villanueva et al. (2010) el ácido ascórbico cede un hidrógeno, produciéndose una transferencia de electrones de doble enlace hacia el oxígeno que sufrió la pérdida de un electrón, repitiendo la misma acción en el siguiente átomo de oxígeno, que sufrió la pérdida del átomo de hidrógeno, hasta establecerse el equilibrio de energía. De acuerdo a esta reacción, el ácido ascórbico cede dos hidrógenos, explicando así su eficiencia como un excelente antioxidante.

Otros efectos que actúan en los mecanismos de inhibición de la peroxidación lipídica del ácido ascórbico y el palmitato de ascorbilo sobre los hidroperóxidos en el aceite de palma, es la reducción de los hidroperóxidos hasta compuestos hidroxil más estables, ya que no permiten que continúen las reacciones en cadena que son propias del mecanismo de los radicales libres (Schieberle *et al*, 1981; Von Uhl *et al*, 1990); otra alternativa en el mecanismo es que el ácido ascórbico puede actuar como un agente quelante de metales (Kanner *et al*, 1997; Fukuzawa, *et al*; 1993), o como un sistema removedor del oxígeno singulete que también contribuye a la peroxidación (Bendich, *et al*, 1986; Lee, *et al*; 1997), El ácido ascórbico es un inhibidor de la acción de las enzimas lipoxigenasas mediante la eliminación de los radicales libres formados durante las reacciones catalizadas por estas enzimas

(Macarrone, *et al*, 1995), igualmente puede eliminar al oxígeno molecular con lo cual disminuye la probabilidad de formación del oxígeno singulete que participa en la peroxidación (Frankel, 1998).

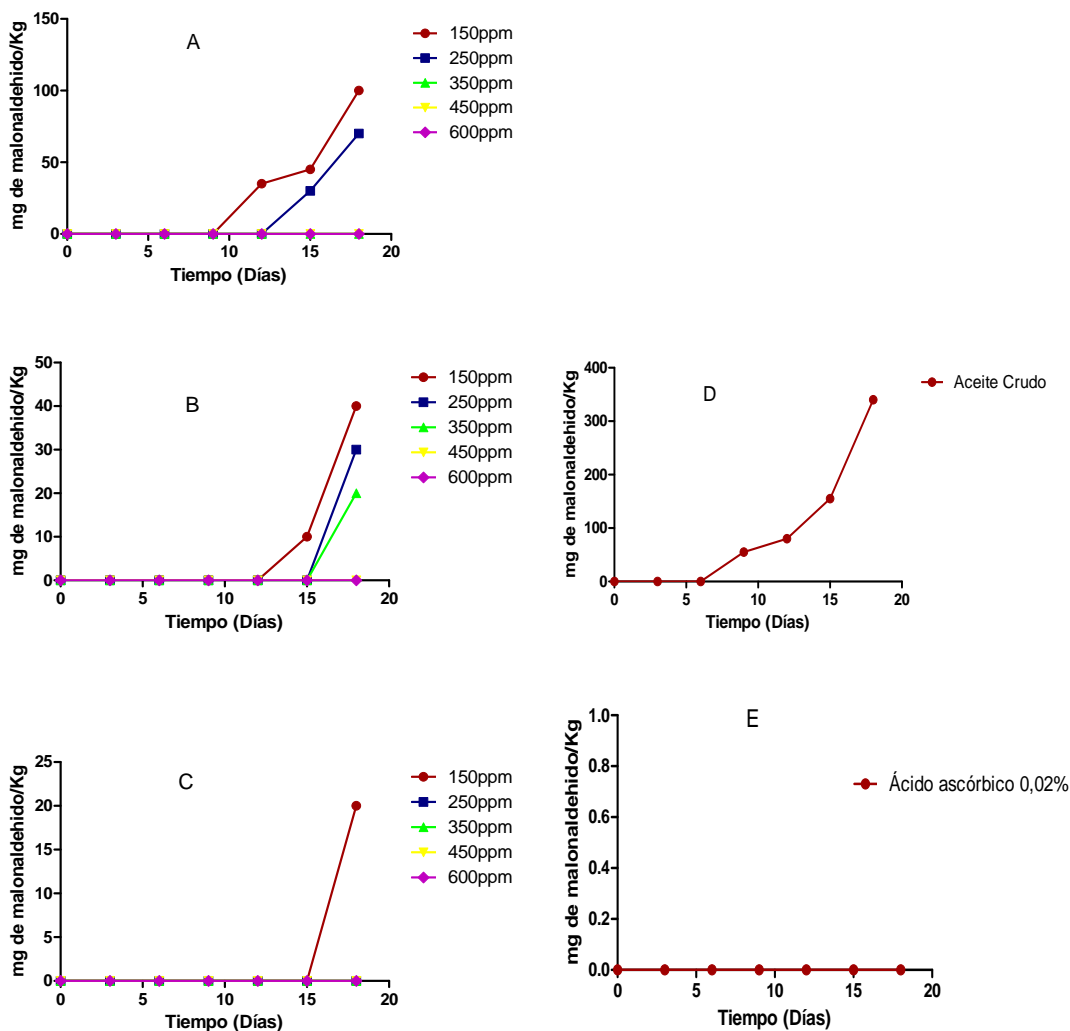
El aceite crudo de palma exhibió los valores más altos de TBARS en todas las etapas de análisis durante el almacenamiento. Un incremento continuo de TBARS se observó en todas las muestras de aceite crudo de palma que contenía AE, durante el tiempo de almacenamiento; este comportamiento se observó con ambos AE obtenidos por HD y HDM.

El AE de oreganito obtenido por HD presentó la menor capacidad de inhibir el proceso oxidativo del aceite de palma, (Figura 13 A); mientras que el AE de orégano retrasó el proceso oxidativo a concentraciones a partir de 350 ppm (Figura 13 B). En todos los tratamientos se observó un efecto de la concentración del AE sobre la oxidación del aceite comestible (Figura 13A-C), a mayor concentración de AE menor contenido de TBARS:

La estabilidad oxidativa lograda con la inclusión del AE de Orégano obtenido por HD puede atribuirse a la capacidad antioxidante que tiene el carvacrol que es el componente mayoritario de este aceite; la actividad antioxidante de este compuesto es debida a la presencia de grupos OH fenólicos en su estructura, los cuales actúan como donadores de hidrogeno con los radicales peróxido producidos durante el primer paso de la oxidación lipídica, de esta forma se retrasa la formación de la enzima hidroxilperoxidasa (Radwan *et al.*, 2008).

Los cambios en el índice TBAR del aceite de palma crudo, conteniendo diferentes cantidades del AE obtenido por HDM y almacenado a 63°C durante 18 días, se presentan en la Figura 14. Ésta, muestra el efecto de las diferentes concentraciones de antioxidantes (ácido ascórbico como control al 0.02%, AE de oreganito, orégano *Vulgare* y orégano borde blanco) sobre la formación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en las muestras de aceite crudo de palma.





**Figura 14. Cambios en el índice TBAR del aceite de palma crudo, conteniendo diferentes cantidades de AE obtenido por HDM, y almacenado a 63 °C durante 18 días. A: oreganito (*Lippia alba mill*); B: orégano (*Orégano vulgare*) C: Orégano borde blanca (*Orégano vulgare ssp*), D: aceite crudo sin aditivo; E: aceite crudo con ácido ascórbico.**

El aceite de palma tratado con los AE de *Lippia alba* y orégano vulgare obtenido por HDM presentaron mayores contenidos de TBARS en comparación con el AE de orégano borde blanco. Se observó un incremento del contenido de TBARS en el tiempo y este fue dependiente de la concentración. Un incremento levemente escalonado de TBARS se observó en el aceite de palma conteniendo AE de orégano y oreganito (Figura 13 A y B), durante el almacenamiento a partir del día 15. El menor valor de TBARS fue obtenido en el aceite de palma tratado con AE de orégano

borde blanco; únicamente en el día 18 de almacenamiento se observó un incremento de TBARS a la menor concentración evaluada (150 ppm, Figura 14C); un incremento en la concentración del AE de orégano borde blanco inhibe por completo la producción de TBARS durante todo el almacenamiento. Es importante resaltar que en la mayoría de los aceites esenciales extraídos por los dos métodos, muestran que el período de inducción corresponde a 12 días para estos compuestos, que es el tiempo en el que aumenta la producción de los compuestos de oxidación, observándose una etapa de latencia y después un incremento repentino. Los resultados sugieren que el proceso de oxidación es una reacción simultánea, donde se van produciendo compuestos oxidados iniciales y finales sin necesidad de alcanzarse puntos de saturación en los primeros compuestos de oxidación. El tiempo de inducción consiste en el punto donde comienza la rancidez oxidativa, es decir, más allá de este punto aumenta significativamente la producción de compuestos finales de oxidación como aldehídos, cetonas e hidrocarburos que generan olores y sabores desagradables en las grasas y aceites, conocido como rancidez oxidativa; proceso que cuando alcanza el tiempo de inducción es incontrolable. El uso de antioxidantes en los alimentos busca alargar esta fase de inducción, para aumentar la vida útil de los productos ricos en ácidos grasos. Muchos autores reportan el uso de extractos naturales que disminuyen los tiempos de oxidación en diversos aceites y sistemas emulsificados (Zapata *et al.* 2013).

La actividad antioxidante de un alimento es la expresión de los diferentes componentes, los cuales se comportan mediante distintos mecanismos de acción reductora en sus interacciones con las especies reactivas de oxígeno (ERO) u otros radicales. La medida de la capacidad antioxidante de alimentos ha tenido mucha relevancia en los últimos años, debido a la calidad de la información que se puede obtener; desde la resistencia a la oxidación, la contribución cuantitativa de sustancias antioxidantes y la actividad antioxidante producida por los alimentos en el organismo al momento de consumirlos (Zapata *et al.* 2013)..

El AE de orégano borde blanco obtenido por el método de HDM disminuyó ostensiblemente el contenido de TBARS en el aceite crudo de palma durante todo el almacenamiento a 63°C, reflejando un efecto inhibitorio en la oxidación lipídica. Por lo tanto, se puede concluir que este AE, en las concentraciones estudiadas, es capaz de proteger el aceite crudo contra la oxidación y se puede recomendar como una buena fuente de antioxidantes naturales para la estabilización de sistemas alimenticios, especialmente los aceites vegetales. Por lo tanto, se puede afirmar que el orégano borde blanco es la especie nativa del departamento de Bolívar (Colombia) más promisoría debido a

presentó la más alta actividad antioxidante y la mayor capacidad de inhibición de la oxidación de aceites comestibles, y esta actividad se debe a la concentración de carvacrol, timol,  $\alpha$ -pineno y  $\gamma$ -Terpineno. Resaltando, que el  $\alpha$ -pineno es una molécula importante en la semisíntesis de vitamina A y E, esta última es una estructura de elevada capacidad antioxidante.

Se puede considerar que en el proceso oxidativo del aceite de palma hay una producción permanente de hidroperóxidos conjugados, los cuales se van consumiendo en el tiempo generando una alta concentración de especies reactivas de oxígeno. Este proceso se puede controlar con el uso de antioxidantes exógenos. El aceite esencial de Orégano borde blanco por todo lo anterior, poseen un gran potencial para la industria agroalimentaria en Colombia, como una fuente antioxidante.

## CONCLUSION

El rendimiento de los AE de *Origanum vulgare* (orégano), *Origanum vulgare* ssp (orégano borde blanco), y *Lippia alba* mill (oreganito) es dependiente del método de extracción utilizado para su obtención. Se obtuvo mayor contenido de AE cuando se empleó la extracción mediante hidrodestilación por arrastre de vapor (HD), en comparación con el método de hidrodestilación asistida por microondas (HDM); sin embargo, esta última técnica es un proceso rápido y relativamente económico en comparación con la HD. Químicamente los aceites esenciales de todas las especies contienen mayoritariamente fenoles como el carvacrol y el timol, a los cuales se les atribuye la buena capacidad antioxidante exhibida en el aceite esencial de orégano y el orégano borde blanco, bajo los diferentes modelos evaluados. Por su parte, el AE de *Lippia alba* mill, obtenido por hidrodestilación, no se comporta como un antioxidante eficiente, posiblemente porque el contenido de timol y carvacrol fue bajo (<1%). Finalmente, el aceite esencial de *Origanum vulgare* ssp (orégano borde blanco) presentó la mayor capacidad de inhibir el proceso oxidativo de una matriz alimenticia lipídica como el aceite crudo de palma, este hecho correlaciona con la alta capacidad antioxidante presentada por este AE en el modelo ORAC lipofílico. Con los resultados obtenidos se establece que los AE de orégano son antioxidantes naturales promisorios, que pueden ser usados en alimentos como posibles sustitutos de los antioxidantes sintéticos puesto que estos AE pueden atrapar radicales libres y prevenir la oxidación.

## RECOMENDACIONES

- Realizar un modelamiento matemático del comportamiento de la capacidad antioxidante y el tiempo de almacenamiento de estos AE en el aceite crudo de palma.
- Realizar el estudio de la estabilidad y de los compuestos fenólicos que actúan como antioxidantes en el aceite crudo de palma.
- Se recomienda en el puerto de inyección de GC realizar inyección *on-column*, al AE de *Lippia alba mill*, para evitar la descomposición de los analitos, así como pruebas de bioactividad, para comparar el efecto del método de extracción sobre la composición y la actividad biológica.

## BIBLIOGRAFÍA

Adams, C. El rol de los antioxidantes en el mantenimiento de la calidad de la grasa. *Aceites y Grasas*. 1997; 391 –399 p.

Ames, B. N., Shigenaga, M. K. And Hagen, T. M., Oxidants, Antioxidants and the Degenerative Diseases Of Aging. *Proceed. Nat. Acad. Sci.*, 1990, 90, 7915-7922.

Arnao MB, Cano A, Acosta M. Methods to measure the antioxidant activity in plant material. A comparative discussion. *Free Rad Res*. 1999; 31: S89-96.

Antolovich, M.; Prenzler, P.D.; Patsalides. E.; McDonald, S.; Robards, K. Methods for Testing Antioxidant Activity. *Analyst*. 2000; 127: 183-198.

Antolovich, M.; Prenzler, P.D.; Patsalides. E.; McDonald, S.; Robards, K. Methods for Testing Antioxidant Activity. *Analyst*. 2000; 127: 183-198.

A. Kilci, D. Gocmen. Phenolic acid composition, antioxidant activity and phenolic content of tarhana supplemented with oat flour. *Food Chemistry* 151. 2014. 547–553

Apak R, Güc'lü K, Demirata B, Özyürek M, C'elik SE, Bektas,og'lu B, Berker KI, Özyurt D. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules* 2007; 12:1496-1547.

Araya, H; Bacigalupo, A. Importancia del aceite de palma africana en la alimentación Latinoamericana. Ed. FAO. Valledupar, Colombia. 1986; 213p

Arcila C, Loarca G, Lecona S, González E. Orégano: Propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *ALAN*, 2004; 54: 100-111.

Arcila Lozano, C.; Loarca, G., Lecona, S. y Gonzalez, E. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. (Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República), Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro. *ALAN*, mar. 2004; 54, (1): 100-111.

Arcila, C.C.; Loarca, G.; Lecona, S.; González, E. El orégano: propiedades composición y actividad biológica de sus componentes. *Arch. Latin. Nutr.* 2004; 54: 1-25

Atoui, A. K., Mansouri, A., Boskou, G., Kefalas, P., Tea And Herbal Infusions: Their Antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem.*, 2005; 89, 27-36.

Aubourg SP, Piñeiro C, González MJ. Quality loss related to rancidity development during frozen storage of horse (Trachurus trachurus). JAOCS 2004; 81(7):671-678

Azuma, K., Ippoushi, K., Ito, H. Higashio, H. Y Terao, J. Evaluation of antioxidative activity of vegetable extracts in linoleic acid emulsion and phospholipid bilayers, J. Sci. Food and Agric., 1999; 79: 2010-2016.

Azuma, K.; Ippoushi, K.; Ito, H.; Higashio, H.; Terao, J. Evaluation of antioxidative activity of vegetable extracts in linoleic acid emulsion and phospholipid bilayers. *J. Sci. Food Agric.* 1999; 79: 2010-2016.

Bacigalupo, A. Palma Aceitera. Utilización del aceite de palma en la alimentación humana. Ed. FAO. Santo Domingo, Ecuador. 1988; 170p.

Badui, D. Lípidos. En: Química de los alimentos. Editorial Alhambra. México D. F. 1986; pp. 159 – 203.

Bagheri, H., Bin Abdul Manap, M., Solati, Z. Antioxidant activity of Piper nigrum L. essential oil extracted by supercritical CO<sub>2</sub> extraction and hydro-distillation. *Talanta* 121. 2014. 220–228.

Baharum, S., Bunawan, H., Ghani, M., Mustapha, W., Noor, N. Analysis of the Chemical Composition of the Essential Oil of *Polygonum minus* Huds. Using Two-Dimensional Gas Chromatography-Time-of-Flight Mass Spectrometry (GC-TOF MS). *Molecules*. 2010; Vol. 15:7006-7015.

Bahl, J.R., Garg, S.N., Singh, S.C., Bansal, R.P., Naqvi, A.A. & Kumar, S. “Composition of linalool rich essential oil from *Lippia alba* grown in Indian plains” *Flavour Fragr. J.* 2000; 15: 199-200.

Bahl, J.R., Sinha, S., Naqvi, A.A., Bansal, R.P., Gupta, A.K. & Kumar, S. “Linalool-rich essential oil quality variants obtained from irradiated stem nodes in *Lippia alba*”, *Flavour Fragr. J.* 2002; 17: 127-132.

Bandoni, A. I. “Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica”. Ciencia y Tecnología para el Desarrollo CYTED. Editorial de la Universidad Nacional de la Plata, La Plata – Argentina, 2002; 27-34, 180-242.

Bandoni, A. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. 1ª Ed, Editorial U. Nacional de la Plata, La Plata, 2000; p.p. 13 – 42.

Bandoni, A., (Ed.), Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica. Editorial de la Universidad Nacional de la Plata. Primera edición. Argentina, 2000; 410 p.

Baratta, M.T., Dorman, H.J.D., Deans, S.J., Biondi, D.M., y Ruberto, G. Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. *J. Essent. Oil Res.* 1998; 10(6): 618-627.

Barrera-Arellano D, Ruiz-Mendez V, Velasco J, Marquez- Ruiz G, Dobarganes. C. Loss of tocopherols and formation of degradation compounds at frying temperatures in oils differing in degree of unsaturation and natural antioxidant content. *J. Sci. Food Agric.* 2002; 82, 1696–1702

Bauer, Kurt., GARBE, Dorothea. Common Fragrance and Flavor Materials. Preparation, Properties and Uses. Fourth Completely Revised Edition. Wiley-VCH. Weinheim (Germany) 2001; 176-177.

Becker, E., Nissen, L., Skibsted, H. Antioxidant Evaluation Protocols: Food Quality or Health Effects. *European Food Research and Technology*, 2004; 219 (6), P. 561 – 571.

Bello, A. Estudios de aceites esenciales de especie *Myrtaceae* de la flora de Pinar del Río. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas. [soreniam@af.upr.edu.cu](mailto:soreniam@af.upr.edu.cu). 1999.

Bendini, A.; Cerretani, L.; Pizzolante, L.; Toschi, T.G.; Guzzo, F.; Ceoldo, S.; Marconi, A.M.; Andreetta, F.; Levi, M. Phenol content related to antioxidant and antimicrobial activities of *Passiflora* spp. *Extracts Eur. Food Res. Technol.* 2006; 223: 102–109.

Biocomercio sostenible Estudio del Mercado Colombiano de Aceites Esenciales. Instituto de investigación de recursos biológicos Alexander von Humboldt, [www.humboldt.org.co/biocomercio](http://www.humboldt.org.co/biocomercio) Bogotá, Colombia. 2003; 109 pp.

Bolilla, C. Manual Aceites Esenciales. Universidad de Antioquia, Facultad de Química Farmacéutica. <http://mail.fq.edu.uy/~planta/pdf/Farmacognosia PE80 /bolilla 4>. 2001.

Botsoglou, N.A.; Fletouris, D.J.; Florou, P.; Christaki, E.; Spais, A.B. Inhibition of lipid oxidation in long-term frozen stored chicken meat by dietary oregano essential oil and  $\alpha$ -tocopheryl acetate supplementation. *Food Res. Intern.* 2003a; 36: 207-213.

Botsoglou, N.A.; Florou, P.; Christaki, E.; Fletouris, D.J.; Spais, A.B. Effect of dietary oregano essential oil on performance of chickens and on iron-induced lipid oxidation of breast, thigh and abdominal fat tissues. *Br. Poult. Sci.* 2002a; 43: 223-230.



Botsoglou, N.A.; Grigoropoulo, S.H.; Botsoglou, E.; Govaris, A.; Papageorgiou, G. The effects of dietary oregano essential oil and  $\alpha$ -tocopheryl acetate on lipid oxidation in raw and cooked turkey during refrigerated storage. *Meat Sci.* 2003b; 65: 1193-1200.

Botsoglou, N.A.; Yannakopoulos, A.L.; Fletouris, D.J.; Tserveni, A.S.; Fortomaris, P.D. Effect of dietary thyme on the oxidative stability of egg yolk. *J. Agric. Food Chem.* 1997; 45: 3711-3716.

Bousbia, N.; Vian, M.A.; Ferhat, M.A.; Petitcolas, E.; Meklati, B.Y.; Chemat, F. Comparison of two isolation methods or essential oil from rosemary leaves: hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food Chem.* 2009; 114: 355-362.

Branchi, B., Galli, C. and Gentili, P., Kinetics of oxidation of benzyl alcohols by the cation and radical-cation of ABTS. Comparison with laccase-ABTS oxidations: an apparent paradox, *Org. Biomol. Chem.*, 2005; 3, 2604-2614.

Brand, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* 1995; 28: 25-30.

Braverman, J.B.S. Introducción a la Bioquímica de los Alimentos. En: Oxidación de Lípidos. Editorial "El manual moderno". Mexico D.F. 1980; pp 248 –266.

Bruun-Jensen, L., Skovgaard, M., Skibsted, L. H., And Bertelsen, G., Antioxidant Synergism Between Tocopherols And Ascorbyl Palmitate In Ccooked, Minced Turkey. *Z. Lebensm Unters Forsch.* 1994; 199, 210-213.

Budowski, P., Recent Research on Sesamin, Sesamol and Related Compounds. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1964; 41, 441-445.

Burt, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of food microbiology.* 2004; vol.94, Issue 3:223-253.

Burin, M., Ferreira-Lima, N., Panceri, C., Bordignon-Luiz, M. Bioactive compounds and antioxidant activity of *Vitis vinifera* and *Vitis labrusca* grapes: Evaluation of different extraction methods. *Microchemical Journal* 114. 2014 155–163.

Cao, G., Sofic, E. And Prior, R. L., Antioxidant Capacity of Tea and Common Vegetables, *J. Agric. Food Chem.*, 1996; 44, 3426-3431.

Castillo-Herrera G, Garcia-Fajardo J, Estarrón-Espinosa M. Extraction method that enriches phenolic content in oregano (*Lippia graveolens* H.B.K.) Essential oil. *Journal of Food Process Engineering*. 2007; 30: 661–669.

Chaudhary, A. K., Nokubo, M., Reddy, G. R., Yeola, S. N., et al., Detection of endogenous malondialdehyde-deoxyguanosine adducts in human liver. *Science*, 1994; 265, 1580-1582.

Chaudhary, A. K., Nokubo, M., Reddy, G. R., Yeola, S. N., Et Al., Detection of Endogenous Malondialdehyde-Deoxyguanosine Adducts In Human Liver. *Science*, 1994; 265, 1580-1582.

Chlodwig. F y Novak, J. Essential oil compounds in a historical sample of marjoram (*Origanum majorana* L., Lamiaceae Breeding of *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem.*, 2001; 48 (9): 4156–4161.

Chun, S., Vattem, D., Lin, Y., Shetty, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochemistry* 40. 2005. 809–816.

Clarke, S. Essential chemistry for aromatherapy. Second edition. Churchill livingstone. Elsevier. 2008; 320 p.

Combariza, M.Y., Blanco, C., Stashenko, E. y Shibamoto, T. “Limonene concentration in lemon (*Citrus volcameriana* peel oil as a function of ripeness”, *J. High Resol.Chromatogr.* 1994; 17: 643-646.

Corral. La solubilidad resulta ser un control de calidad sencillo para la detección de adulteraciones, pues el rango de solubilidad total es pequeño de 95-90%, para el aceite esencial de orégano puro. 2008.

Corral T. C. L. Monitoreo De Control De Calidad Sobre El Efecto De Diferentes Materiales En La Composición Del Aceite Esencial De Orégano. Tesis Profesional. Instituto Tecnológico De Durango. Durango, Méx. 2008.

Cottrell RC. Introduction: nutritional aspects of palm oil. *J Clin Nutr* 1991; (53): 989S-100S.

De Mastro, G. Crop domestication and variability within accessions of *Origanum* genus. In: Padulosi. S.editor. *Oregano. Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano, 8-12 May CIHEAM, Valenzano (Bari), Italy. 1997; p. 34-48.*

Deighton, N.; Gridewell, S.M.; Deans, S.J.; Groodman, B. A. Identification by EPR spectroscopy of Carvacrol and Thymol as the major sources of free radicals in the oxidation of plant essential oils. *J. Sci. Food Agric.* 1993; 63: 221-225.

Delgado, T., Marinero, P., Asensio-S.-Manzanera, M., Asensio, C., Herrero, B., Pereira, J., Ramalhosa, E. Antioxidant activity of twenty wild Spanish *Thymus mastichina* L. populations and its relation with their chemical composition. *LWT - Food Science and Technology* 57. 2014. 412 - 418.

Deng, Y., Yang, G., Yue, G., Qian, B., Liu, Z., Wang, D., Zhong, Y., Zhao, Y. Influences of ripening stages and extracting solvents on the polyphenolic compounds, antimicrobial and antioxidant activities of blueberry leaf extracts. *Food Control* 38. 2014. 184 – 191

Domínguez, X.A., Métodos de investigación fitoquímica, Ed. Limusa, México, 1988; 232 p.

Dos Santos, F.; Arimatéia, J.; Gracas, A.; Lima, S.; Reis, F. Composition and Biological Activity of Essential Oil from *Lippia origanoides* H.B.K. *J. Essen. Oil Res.* 2004; 16: 504- 506.

Dogu-Baykut, E., Gunes, G., Decker, E. Impact of shortwave ultraviolet (UV-C) radiation on the antioxidant activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Food Chemistry* 157. 2014. 167–173

Dragland, S.; Senoo, H.; Wake, K.; Holte, K.; Blomhoff, R. Several culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants. *Am. Soc. Nutr. Sci.* 2003; 133: 1286- 1290.

Dugan, L. R., Natural Antioxidants. In: *Autoxidation in Food and Biological Systems*, Eds., Plenum Press; New York, 1980; 261-282.

Duke, J. A. Handbook of Medicinal Herbs. CRC Press. USA. 2002; 870 p.

Dustan, A.B, Harris, S. R., Oxygen free radicals and antioxidants. *J. Am. Pharm.* 1994; 34 (9): 26 – 35.

Escobar, P.; Leal, S.M.; Herrera, L.V.; Martinez, J.R.; Stashenko, E. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. *Mem. Inst. Osw. Cruz.* 2010; 105: 184-190.

Escobar, R. Hace tres generaciones cultivan bananos y palmas. *Revista carta ganadera.* Bogotá Colombia. 1998; Pag 14 de 24.

Esterbauer, H., Schaur, R. J., Zollner, H., Chemistry and Biochemistry of 4 - Hydroxynonenal, Malonaldehyde and Related Aldehydes. *Free Radical Biol. Med.* 1991; 11, 81-128.

Farag, R. S., Ali, M. N., y Taha, S. H. Use of some essential oils as natural preservatives for butter. *Journal of American Oil Chemists Society*, 1990; 67, (3):188-191.

Fennema, O. *Foods Chemistry*. In: *Lipids*. Editorial Marcel Dekker Inc. Unit State. 1985; pp.139 – 244.

Ferhat, M.; Meklati, B.; Smadja, J.; Chemat, F. An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel. *J. Chromatogr. A.*, 2006; 1112, p.p. 121-126.

Flinne, G., Ikins, G.W., Williams, J.J., Welborn, J.L., *Antioxidants and lipid oxidation in foods*. Inside laboratory management. 1998; 6: 24 – 26

Floegel A, Kim DO, Chung SJ, Koo SI, Chun OK. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis* 2011; 24 (7): 1043-1048.

Florez, Rivera E. *Potencial Productivo Del Orégano (Lippia Graveolens Hbk.) Y Calidad De Su Aceite Esencial En Dos Localidades De El Mezquital*. Proyecto De Grado. 2009; P.P 65-73.

Ford, S. E., Hook, J. B., Bond, J. T., the Effects of Butylated Hydroxyanisole and Butylated Hydroxytoluene on Renal Function in the Rat. II. Effects on Organics Acid and Base Transport. *Food Cosmet. Toxicol.* 1980; 18, 21-26.

Galleti, G.C.; Bonaga, G. Analytical methods in the study of essential oils extraction, separation and identification techniques. *Chim. Acta Turc.* 1988; 16: 291-296.

García Barriga, H. *Flora medicinal de Colombia. Botánica médica*, 2a Ed., Tercer Mundo, Bogotá. 1992.

Gaviria, C., Ochoa, C., Sánchez, N., Medina, C., Lobo, M., Galeano, P., Mosquera, A., Tamayo, A., Lopera, Y., Rojano, B. Actividad antioxidante e inhibición de la peroxidación lipídica de extractos de frutos de mortiño (*Vaccinium meridionale SW*). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 2009; 8 (6), 519 – 528.

Go SH, Choo YM, Ong SH. Minor constituents of palm oil. *J Am Oil Chem Soc.* 1985; (62): 237-40  
Go SH, Choo YM, Ong SH. Minor constituents of palm oil. *J Am Oil Chem Soc.* 1985; (62): 237-40

Golmakani, M-T., Rezaei, K. Comparison of Microwave-Assisted Hydrodistillation with the Traditional Hydrodistillation Method in the Extraction of Essential Oils from *Thymus vulgaris* L. *Journal of Food Chemistry*. 2007; 12 (84): 1-24.

Gonzales, M. C.; Soto, M. Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano Mexicano. *Rev. Fitotec. Mex.*, 2007; 30 (1), p.p. 43-49.

Granados, C., Yáñez, Y., Santafé, G. Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*. 2012. 10(1):12-23.

Grob, L. R., *Modern practice of gas chromatography*. John Wiley & Sons, Inc, New York: 1995; 896 p.

Guenther, E. *The Essential Oils*. Volúmenes I y III, Edition Van Nostrand, New York, 1995; Vol. I p. 427 y Vol. III p. 777.

Gupta, M.P. (Ed.) *270 Plantas medicinales Iberoamericanas*, 1995; 1a Ed., CYTED-SECAB, Bogotá.

Gutteridge, J. C. M. And Halliwell, B., *Antioxidants in Nutrition, Health, and Disease*, Oxford University Press, New York, 1994; Pp. 40-74; 90-93.

Guzman R., Gallegos I., Loredo G. Antioxidant effect of oregano (*Lippia Berlandieri* v. *Shauer*): essential oil and mother liquors. *Food Chimestri*. 2006; 102.335-335.

Hartley, C. *The Oil Palm*. Lonhman Inc. New York, U.S.A. 1984; 806p.

Habib, H., Al Meqbali, F., Kamal, H., Souka, U., Ibrahim, W. Bioactive components, antioxidant and DNA damage inhibitory activities of honeys from arid regions. *Food Chemistry* 153. 2014. 28–34

Helrick K, *Official Methods of Analysis*. 15ed. ed. AOAC Arlington: Association of Official Analytical Chemist, 1990; 898.

Hirasa, K., y Takemasa, M. *Spice science and technology*. New York: Dekker Inc. Book, 1998; pp12-124.

Hosu, A., Cristea, V., Cimpoi, C. Analysis of total phenolic, flavonoids, anthocyanins and tannins content in Romanian red wines: Prediction of antioxidant activities and classification of wines using artificial neural networks. *Food Chemistry* 150. 2014. 113–118.

Huang, D.; Ou, B.; Prior, R.L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem*. 2005; 53: 1841-1856.

Iwakami, M. Peroxides as a factor of atherosclerosis. *Nagoya J. Med. Sci.*, 1965; 28, 50-56.

Jennings, W., Mittlefehldt, E., Stremple, P., Analytical gas chromatography. Second Edition. Academic Press. San Diego, California, 1987; 259 p.

Jirovetz, L., Chemical composition, antimicrobial activities and odor descriptions of some essential oils with characteristic floral-rosy scent. *Recent Res. Devel. Agron. Horticul.*, 2006; 2, 1-12.

Jung, M. Y., and Min, D. B., Effects of Quenching Mechanism of Carotenoids on the Photosensitized Oxidation of Soybean Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1991; 68, 653-658.

Jung, M. Y., and Min, D. B., Effects of  $\alpha$ -Tocopherol and  $\Delta$ -Tocopherols and Oxidative Stability of Soybean Oil. *J. Food Sci.*, 1990; 55, 1464-1465.

Kahkonen, M.P.; Hopia, A.I.; Vuorela, H.J.; Rauha, J.P.; Pihlaja, T.S.; Heinonen, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47: 3954-3962.

Kahkoren, M. P., et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.*; 1999; 47(10): 3954-3962.

Kingston, H. M; Jassie, L. B. Introduction to microwave sample preparation, theory and practice. Washington: American Chemical Society. 1988; p.p. 7-3.

Kintzios, S. E. Profile of the multifaceted prince of the herbs. *In: Kintzios, S. E. The genera Origanum and Lippia*. 1st Edition. Taylor and Francis, New York. 2002; 3-8 p.

Kitson, G. Fulton., Larsen, S. Barbara., McEwen, N. Charles. Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide. Academic Press, San Diego, California, 1996; 192 p.

Kokkini , Karousou , Dardioti , Krigas , Lanaras . Autumn essential oils of greek oregano. *Phytochemistry*. 1997; 44 (5): 883-886.

Krause, E.L.; Ternes, W. Bioavailability of the antioxidative thyme compounds thymol and D-cymene-2, 3-diol in eggs. *Eur. Food Res. Technol.* 1999; 209: 140-144.

Kulisic, T.; Radonic, A.; Katalinic, V.; Milos, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chem.* 2004; 85: 633-644.

Kuskoki, M. E.; Asuero, G. A.; García, M. C. Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, 2004; 24 (4), p.p. 691-693.

Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Cien. Tecnol. Aliment.* 2005; 25 (4), p.p. 726-732.

Lagouri V, Blekas G, Tsimidou M, Kokkini S, Boskou D. Composition and antioxidant activity of essential oils from oregano plants grown in Greece. *Z Lebensmitt. Unters. Forsch.* 1993; 197(1): 20-23.

Lampe J. Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies *American Journal of Clinical Nutrition*, 1.999; Vol. 70, No. 3, 475S-490S.

Larson, R.A. Naturally occurring antioxidants. *Am-J-Clin-Nutr.* Sep; 70(3 Suppl): 1997; 475S-490S. Book 24-130.

Lawrence, Brian M. *Essential Oils 1995-2000*. Editor Natural Flavor and Fragrance, Materials Perfumer & Flavorist. Published by Allured Publishing Corporation. 2003; pp. 26-29; 146-148; 225-235.

Lorenzo, D., Paz, D., Davies, P., Vila, R., Cañigüeral, S. & Dellacassa, E. "Composition of a new essential oil type of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown from Uruguay", *Flavour Fragr. J.* 2001; 16: 356-359.

Loziene K, Venskutonis PR, Sipailiene A, Labokas J. Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. *Food Chem.* 2007; 103: 546–559.

Lucchesi, M.E J. Smadja, L. Favretto, G. Colnaghi and F.Visinoni Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: A rapid, clean and environmentally friendly approach. 2006; Pages 157-160

Madhavi D, Singhal R, Kulkarni, P. Technological aspects of food antioxidants. *Food Antioxidants. Technological, toxicological and health perspectives*. Marcel Dekker, Inc.; 1996; 4:159-265.

Madsen, H. L. y Bertelsen, G. Spices as antioxidants. *Trends in food science & technology*, 1995; 6, (8): 271-277.

Marnett, L. J., Hurd, H. K., Hollstein, M. C., Et Al., Naturally Occurring Carbonyl Compounds Are Mutagens In *Salmonella* Tester Strain Ta104. *Mutation Res.* 1985; 148, 25-34.

Martínez, A. Aceites Esenciales. Universidad de Antioquia, Facultad de Química Farmacéutica. Medellín. 2003.

Masada, Y., Analysis of Essential Oils by gas chromatography and Mass spectrometry, Ed, John Wiley, N.Y, 1997; 330 p.

Matiz G, Osorio MR, Camacho F, Atencia M, Herazo J. Diseño y evaluación *in vivo* de fórmulas para acné basadas en aceites esenciales de naranja (*Citrus sinensis*), albahaca (*Ocimum basilicum* L) y ácido acético. Biomédica: Revista del Instituto Nacional de Salud. 2012. 32(1).

Medina, L. A. Protección de aceites con antioxidantes. Soya noticias. 1997; 251: 6 –10.

Mendivelso, D.L.; Olivares, M.C. Estudio de los metabolitos secundarios volátiles en hojas frescas de *Pelargonium graveolens* (geranio), en función del método de extracción y su desarrollo vegetativo. Trabajo de grado (Química). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Bucaramanga. 2007; 202 p.

Mendoza M. M. P. Influencia Del Tiempo De Almacenamiento En La Calidad Del Aceite Esencial De Orégano *Lippia graveolens* H.B.K. f. *berlandieri* Schauer. Tesis profesional. Facultad de Ciencias Químicas. UJED. Durango. 2008.

Meunier, J; Hardon, J. Interspecific Hybrids between *Elaeis guineensis* and *Elaeis oleifera*. In Corley R: H: V; et al Editors, Oil Palm Research. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, the Netherlands. 1976; Pag 127 - 137.

Milos, M.; Mastelic, J.; Jerkovic, I. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*). Food Chem. 2000; 71: 79-83.

Monsalve, L. A. Comparación De La Composición Química De Los Aceites Esenciales De Las Plantas De *Lippia Alba* (Mill) N.E. Brown, Proveniente De Diferentes Regiones De Colombia. Proyecto De Grado. 2007; P.P 113-119.

Moon, J.K.; Shibamoto, T. Antioxidant assays for plant and food components. *J. Agric. Food Chem.* 2009; 57: 1655-1666.

Morrison, R., Boyd, R., Química Orgánica. En: Grasas. Editorial Addison –Wesley Iberoamericana. Nueva York. 1990; pp. 1241 – 1256.

Moure, A., et al Natural antioxidants from residual sources. Food Chem., 2001; 72(2): 145-171.



Nagendran B, Unnithan U, Choo Y, and Sundram K. Characteristics of red palm oil, a carotene-and vitamin E- rich refined oil for food uses. *Food Nutr Bull.* 2000; 21 (2): 189-94.

Namiki, M. Antioxidants/antimutagens in food. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1990; 29, 273-300.

Namiki, M. Antioxidants/antimutagens in food. Department of Brewing and Fermentation, Tokyo University of Agriculture, Japan. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1990; 29(4): 273-300.

Nawar, W. W., S. K. Kim, and M. Vajdi Measurement of oxidative interactions of cholesterol. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1991; 68:496–498.

Nedyalka VY, Emma MM. Stabilisation of edible oils with natural antioxidants. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2001; 103(11):752-767.

Nenadis, N., Wang, L-F., Tsimidou, M., And Zhang, H-Y., Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS.+ Assay, *J. Agric. Food Chem.*, 2004; 52, 4669-4674.

Orthofer, T.; Erikson, D.; Mounts, T. Curso básico de aceites y grasas comestibles (ciencia y tecnología). Ed. AOCS. Illinois, U.S.A. 1991; 200p.

Ortuño, M. Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. Aiyama, España, 2006; 1ed. pp.7-109.

Ortuño S. M. F. Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. Aiyana Ediciones. España, 2006; pp 275.

Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. y Deemmer, E. Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays. *Agric. Food Chem.* 2002; 50, 3122–3128.

Ozcelik, B.; Lee, J.H.; Min, D.B. Effects of light, oxygen and pH on the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method to evaluate antioxidants. *J. Food Sci.* 2003; 68: 487-490.

Padilla, F., Rincón, A. y Bou-Rached. L. Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Farmacia, Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición, 2008; Vol. 58 N° 3.

Pascual, M.E.; Slowing, K.; Carretero, M.E.; Villar, A. “Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae)”. *IL Farmaco*, 2001; 56, p.p. 501-504.

Patterson, H. Handling and storage of oilseeds, oils, fats and meal. Ed. Elsevier. New York, U.S.A. 1989; 394p.

Peixoto, H. Palma aceitera. Papel de aceite de palma en la solución de los problemas de bajo consumo calórico en América Latina. Su consumo y la salud humana. Ed. FAO. Valledupar, Colombia. 1987; 213p.

Percival, M. Antioxidants. *Clin. Nutr. Insight*, 1998; 31, 1-4.

Petukhov, I, Malcolmson, L. J., Przybylski, R., Armstrong, L. Storage stability of potato chips fried in genetically modified canola oils. *JAOCS*. 1999; 76: 889 –896.

Pino, J.A., Ortega, A.G., Rosado, A., Rodríguez, M. & Balujar, R. “Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown”, *Rev. Cubana Farm.* 1997; 30: 1-8.

Pokorny, J., Yanishlieva, N. And Gordon, M., (Ed.), Antioxidants in food practical applications, Woodhead Publ. Cambridge, 2001; 381 p.

Pomilio, A. B.; Seldes, A. M.; Burtón, G. Introducción al estudio de los productos naturales. Monografías OEA. Washington, D.C., 1985; 54 (30), p.p. 1-3.

Potter, N. La ciencia de los alimentos. Ed. EDUTEX. México D.F. México. 1973; 749p.

Poulose, A.J.; Croteau, R. Biosynthesis of aromatic monoterpenes. Conversion of gamma-terpinene to p-cymene and thymol in thymus vulgaris l. *Arch. Biochem. Biophys.* 1978; 187: 307-314.

Prior, R. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *Am J Clin Nutr* 2003; 78 (suppl):570S–8S.

Prior, R.L; Wu, X.; Schaich, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53: 4290-4302.

Puertas, M. Desarrollo un método analítico para la determinación de compuestos carbonílicos volátiles y la evaluación de la posible actividad antioxidante in vitro de algunos productos naturales y sintéticos. Tesis de doctorado. Química. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Bucaramanga. 2002.

Putievsky, E., Dudai, N. y Ravid, U. Cultivation, selection and conservation of oregano species in Israel. Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano, 8-12 May, Valenzano (Bari), Italy. 1997; p. 102-109.

Quesada, G. Cultivo e industria de palma aceitera (*Elaeis guineensis*). Ed. Infoagro. San José, Costa Rica. 1998; 67p.

Radwan, N.L.; Hassan, R.A.; Qota, E.M.; Fayek, H.M. Effect of Natural Antioxidant on Oxidative Stability of Eggs and Productive and Reproductive Performance of Laying Hens. *Inter. J. Poult. Sci.* 2008; 7:134-150.

Rautenbach F, Venter I. Hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity of commonly consumed South African fruits, vegetables, grains, legumes, fats/oils and beverages. *J Food Compos Anal.* 2010; 23(7):753-61.

Ray, M., Flavor, fragrance and odor analysis. Ed. Marcel Dekker, INC., New York. 2002; 424 p.

Re, R., Pellegrini, A., Proteggente, A., Pannala, A., et al., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.*, 1999; 26, 1231-1237.

Reverchon, E.; De Marco, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *J. Supercrit. Fluids.* 2006; 38: 146-166.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G., A Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.* 1996; 7, 933-956.

Risch, S. J. y Chi-Tang Ho. Spices. Flavor chemistry and antioxidant properties, ACS, Washington. Book, 1997; pp10-135.

Rios de Souza, V., Pimenta Pereira, P., Teodoro da Silva, T., de Oliveira Lima, L., Pio, R., Queiroz, F. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chemistry* 156. 2014. 362–368.

Rocha, N.E.; Gallegos, J.A.; Gonzalez, R.F.; Ramos, M.; Rodriguez, M.E.; Reynoso, R.; Rocha, A.; Roque, M.R. Antioxidant effect of oregano (*Lippia berlandieri* v. Shauer) essential oil and mother liquors. *Food Chem.* 2007; 102: 330-335.

Rodríguez A, Lozada V, Larraín MA, Quitral V, Vinagre J, Aubourg, SP. Development of lipid changes related to quality loss during the frozen storage of farmed coho salmon. *J Am Oil Chem Soc.* 2007; 84:727-734.

Rouis-Soussi, L., Boughelleb-M'Hamdi, N., El Ayeb-Zakhama, A., Flamini, G., Ben Jannet, H., Harzallah-Skhiri, F. Phytochemicals, antioxidant and antifungal activities of *Allium roseum* var. *grandiflorum* subvar. *Typicum* Regel. *South African Journal of Botany* 91. 2014. 63–70.

Russo, M.; Galletti G.C.; Bocchini, P.; Carnicini, A. Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Oreganum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) letswaart): A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. 1. Inflorescences. *J. Agric. Food Chem.* 1998; 46: 3741-3746.

Sacchetti, G, et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 2004; 91, (4): 621-632.

Sagai, M., Ichinose, T., Age-Related Changes In Lipid Peroxidation As Measured By Ethane, Ethylene, Butane and Pentane in Respired Gases of Rats. *Life Sci.*, 1980; 27, 731-738.

Saito, Y., Hotta, N., Sakamoto, N., Matsuoka, S., Ohishi, N., Yagi, K., Lipid Peroxide Level in Plasma of Diabetic Patients. *Biochem.*, 1979; 79, 267-270.

Salgar, W. Evaluación en dos sistemas lipídicos modelo de la actividad antioxidante in vitro de aceites esenciales extraídos de las plantas pertenecientes a la familia Labiatae. Tesis de maestría. Química. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Bucaramanga. 2002.

Sánchez, F.J. Extracción De Aceites Esenciales. Experiencia colombiana. II Segundo congreso internacional de plantas medicinales y aromáticas. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. 2006.

Sánchez-Moreno C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Tech Int.* 2002; 8:121- 137.

Sarker, S.D.; Latif, Z.; Gray, A.I. Natural products isolation. Humana Press. 2006; 515 p.

Satinder A. Chromatography and separation science. Ed, *Acad. Press.* Elsevier Science (USA). 2003.

Schauss, A.G.; Wu, X.; Prior, R.L.; Ou, B.; Huang, D.; Owens, J.; Agarwal, A.; Jensen, G.S.; Hart, A.N.; Shanbrom, E. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze dried amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Acai). *J. Agric. Food Chem.* 2006; 54: 8604-8610.

Senatore, F. & Rigano, D. "Essential oil of two *Lippia* spp. (Verbenaceae) growing wild in Guatemala", *Flavour Fragr. J.* 2001; 16: 169-171.

- Shahidi, F. y Wanasundara P. Phenolic antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1992; 31, 67-103.
- Sherwin, E. R. Oxidation and antioxidants in fat and oil processing. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1979; 5: 809 – 814.
- Sherwin, E. R., Antioxidant for Vegetable Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1976; 53, 430-436.
- Shibamoto. T., Analysis of Essential Oils, In: Jennings, W. Gedt, Applications of Glass Capillary Gas chromatography, Ed. Marcel Decker, N.Y, 1981; 472 p.
- Simándi, B. et al. Supercritical carbon dioxide extraction and fractionation of oregano oleoresin. *Food Res. Int.*; 1998; 31 (10): 723-728.
- Six, P., Current research in natural food antioxidants, INFORM, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1994; 5, 679-688.
- Skuola, Gotsiou, Naxakis, Johnson CB. A chemosystematic investigation on the mono- and sesquiterpenoids in the genus *Origanum* (Labiatae). *Phytochemistry*. 1999; 52: 649-657.
- Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Ri\_zner Hra, A., Simoni, M., Knez, Z. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry* 89. 2005. 191–198.
- Smith- Palmer A. y Stewart J. (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Applied Microbiology*, 26(2): 118–122.
- Soler, E.; Dellacassa, E.; Moyna, P. Composition of *Aloysia gratissima* flower essential oil. *Plant. Med.* 1986; 52: 488-490.
- Souto, F.A.; De Jesus, M.; Cardenas, O. Hernandulcin is the major constituent of *Lippia dulcis* Trev. (Verbenaceae). *Nat. Prod. Lett.* 1996; 8: 151-158.
- Souto, F.A.; De Jesus, M.; Cardenas, O.; Acuna, M.F.; Melendez, P.A.; Romero, L. Terpenoid composition of *Lippia dulcis*. *Phytochemistry*. 1997; 44: 1077-1086.
- Stashenko, E. E., Ferreira, M. C., Sequeda, L. G., Mateus, A., Cervantes, M., Martínez, J. R., “Desarrollo de un método para monitoreo de la degradación oxidativa en lípidos y evaluación de la actividad antioxidante de productos naturales”. *Revista Arte y Ciencia Cosmética*, 1997; 8, 21-27.

Stashenko, E. E., Puertas, M. A. Y Combariza, M.Y. Volatile secondary metabolites from *Spilanthes Americana* obtained by simultaneous steam distillation-solvent extraction and supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A*, 1996; 752(1-2):223- 232.

Stashenko, E. E; Combariza, J.; Puertas, M. Aceites Esenciales: Técnicas De Extracción Y Análisis. Laboratorio De Cromatografía, Uis, 1998; 30 P.

Stashenko, E., Quiroz, N. Y Martínez, J. Study of Colombian Ylang-Ylang (*Cananga odorata*) oils obtained by different extraction techniques. *J. High Resol. Chromatogr.*, 2007; 19(6):353-358.

Stashenko, E., Jaramillo, B, Y Martínez, J. Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante in vitro de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias*, 27, 2003; p. 579 – 597.

Stashenko, E.; Ruíz, C.A.; Arias, G.; Durán, D.C.; Salgar, W.; Cala, M.; Martínez, M.R. Lippia organoides chemotype differentiation based on essential oil GC-MS analysis and PCA. *J. Sep. Sci.* 2010; 33: 93-103.

Suematsu, T., Abe, H., Liver And Serum Lipid Peroxide Level In Patients With Liver Diseases. In: *Lipid Peroxides In Biology and Medicine*, Yagi, K., Ed., Acad. Press: New York, 1982; 285-293.

Sundram K, Sambanthamurthi R, Tan YA. Palm fruit chemistry and nutrition. *Asia Pac J Clin Nutr.*; 2003; 12 (3): 355-62.

Taufert G, Geovanna; Martinez, Jairo R and Stashenko, Elena E. Evaluación de la actividad antioxidante de aceites esenciales en emulsiones degradadas por radiación ultravioleta. *Rev.Colomb.Quim.* 2005; vol.34, n.1 [cited 2013-12-06], pp. 43-55

Thomann, R., Ehrich, J. y Bauermann, U. Distillation and use of essential oils from dill, celery, lovage and parsley made in Germany. *Acta Hort.* 1993; 333:101-11.

Thomas M.G y Schumann D. R. Using the forest instead of the tree: Income opportunities in special forest products. *Midwest Research Institute, Kansas City, M.O, USA: 1992; 4K. 8.*

Tomy, G., Stern, G., Muir, D., Fisk, A., Cymbalisky, C., Westmore, J. Quantifying C10-C13 Polychloroalkanes in Environmental Samples by High-Resolution Gas Chromatography/Electron Capture Negative Ion High-Resolution Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 1997; Vol. 69: 2762-2771.

Valenzuela, A. And Nieto, S., Synthetic and natural antioxidants: food quality protectors. *Grasas y Aceites*, 1996; 47(3), 186-196.

Valenzuela, A., Nieto, S. (1995). Los antioxidantes: protectores de la calidad en la industria alimentaria. *Aceites y Grasa*. Septiembre 1995; 310 –321.

Valgimigli, L., Banks, J. T., Lusztyk, J., And Ingold, K. U., Solvent effects on the antioxidants activity of vitamine E, *J. Org Chem.*, 1999; 64, 3581-83.

Villanueva, J., Condezo, L., Asquieri, E. 2010. Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante, en la cáscara de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K) McVaugh). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 30(Supl.1): 151-160.

Wanasundara, U., Amarowicz, R., Shahidi, F., Isolation and Identification of Antioxidative Component in Canola Meal. *J. Agric. Food Chem.*, 1994; 42, 1285-1290.

Wilkins, MB. The physiology of plant and development, McGraw-Hill. University of California-Small Farm Center. Culture Information for Oregano. 1998.

Willett, C. W., Micronutrients and Cancer Risk. *Am. J. Clin. Nutr.* 1994; 59, 162S-165S.

Wu, K., Zhang, W., Addis, P. B., Et Al., Antioxidant Properties of Wild Rice. *J. Agric. Food Chem.*, 1994; 42, 34-37.

Yanishlieva NV, Marinova EM, Gordon MH, Raneva V. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chem.* 1999; 64(1): 59-66.

Yépez, B. Extracción de aceite esencial de limoncillo (*Cymbopogon citratus*) con dióxido de carbono super crítico. Univalle, XXI Congreso Colombiano de Ingeniería Química, 3, 5. 2001.

Young, I. S. And Woodside, J. V., Antioxidants in Health and Disease. *J. Clin. Pathol.* 2001; 54, 176-186.

Zamora, J. Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud Antioxidants: micronutrients fighting for health. *Rev Chil Nutr*, 2007; Vol. (34):1.

Zoghbi, M.G.B., Andrade, E.H.A., Santos, A.S., Silva, M.H.L. & Maia, J.G.S. "Essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. grown wild in the Brazilian Amazon", *Flavour Fragr. J.* 1998; 13: 47-48.

Zapata, A., Cogollo, A., Rojano, B. 2013. Nutraceutical potential of Choibá almond oil or mountain almond (*Dipteryx oleifera* Benth.). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 18(3):368-380

Zulueta, A.; Esteve, M.; Frigola, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chem*. 2009; 114: 310-316

Zygadlo, J. A., Lamarque, A. L., Maestri, D. M., Grosso, N. R., Empleo De Aceites Esenciales Como Antioxidantes Naturales. *Grasas Y Aceites*, 1995; 46 (4-5), 285-28

Zhao, Y., Du, S., Wang, H., Cai, M. In vitro antioxidant activity of extracts from common legumes. *Food Chemistry* 152. 2014. 462–466



# ANEXOS

## **ANEXO 1. BAUCHER DE PLANTAS**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE MEDELLÍN

FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOCIENCIAS

**HERBARIO GABRIEL GUTIERREZ V. (MEDEL)**  
**Registro Nacional de Colecciones Biológicas # 016**

### CERTIFICADO DE DETERMINACIÓN Y DEPÓSITO DE MATERIAL BOTÁNICO

Fecha de expedición: 25 de Enero de 2012

Colector: Miladys Torrenegra y Antonio Bustillo

Documento de identidad:

Procedencia: Corregimiento de Membrillal, municipio de Cartagena, Departamento de Bolívar

Nombre del proyecto o colección obsequiada: Torrenegra M. 01.

Teléfono/fax: \_\_\_\_\_ correo-e: \_mtorrenegraa@hotmail.com

#### Descripción de los ejemplares recibidos:

Total de ejemplares recibidos: 1 (3 duplicados)

Observaciones sobre las condiciones de los ejemplares (p.ej. daños mecánicos, problemas fitosanitarios, condiciones de montaje): Ejemplar en buenas condiciones y en estado fértil.

#### IDENTIFICACION

**Familia:** VERBENACEAE

**Nombre científico:** *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. ex Britton & P. Wilson

**Determinador:** Jorge Vélez, Ing. Agrónomo-Botánico, Curador de colecciones.

**Recursos utilizados para la identificación:** Rueda, R. 2012 (ined). LAMIACEAE-*Lippia*. En: Davidse, G., M. Sousa Sánchez, S. Knapp & F. Chiang Cabrera. (eds.). Rubiaceae a Verbenaceae. *Fl. Mesoamer.* 4(2).

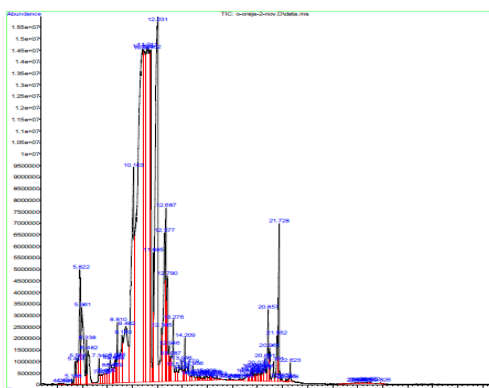
Por medio de la presente, se da cumplimiento con la reglamentación del Decreto 309 de 2000 (artículo 8 y 14) y la resolución 1115 de 2000 (artículo 5) del Ministerio del Medio Ambiente, por los cuales se obliga a depositar en una colección registrada las muestras producto de estudios ambientales o actividades de investigación y se faculta a estas colecciones para la expedición de la constancia de depósito.

El Herbario Gabriel Gutiérrez V. "MEDEL" ha recibido el siguiente material en calidad de donación permanente, lo cual significa que el material no podrá ser reclamado posteriormente por el donante u otra persona, pues entra a formar parte oficial de la colección del herbario. Treinta (30) días calendario después de recibidos los ejemplares el herbario dispondrá de ellos y en las publicaciones que sean citados se realizará bajo la sigla MEDEL como colección deferencia.

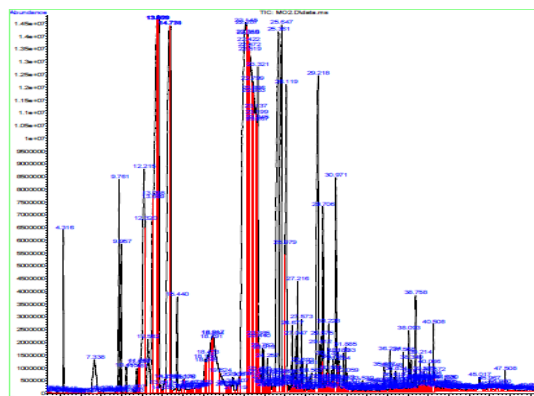
ciencia, tecnología e innovación para el país

Calle 59A N° 63-20, Autopista Norte - Bloque 11, Oficina 118  
Teléfono: (57-4) 430 9348 Conmutador: (57-4) 430 9000 Ext. 49343 Fax: (57-4) 430 93 41  
Correo electrónico: herbario\_med@unal.edu.co / Medellín Antioquia, Colombia, Sur América

**ANEXO 2. ANALISIS CROMATOGRAFICO DE LOS ACEITES  
ESENCIALES OBTENIDOS POR HD Y HDM**

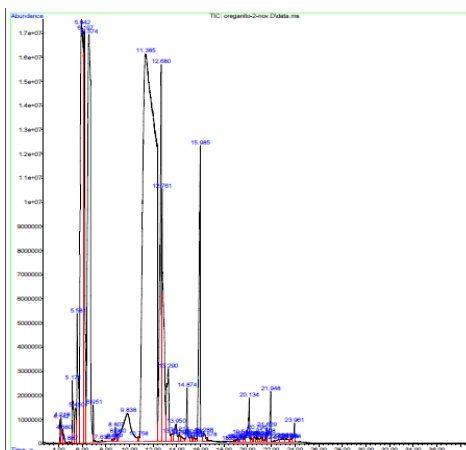


A

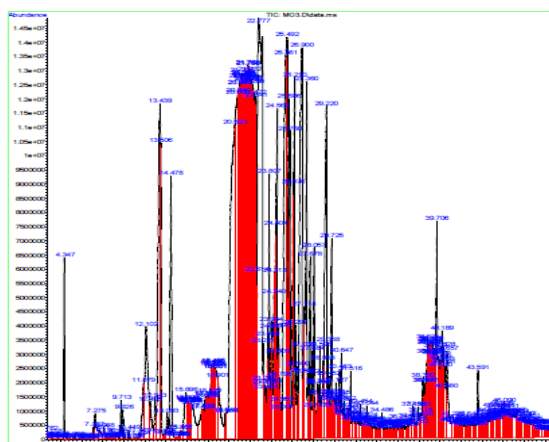


B

Perfil cromatográfico del aceite esencial de Orégano borde blanco (*Origanum vulgare ssp*):  
 A) obtenido por el método de hidrodestilación asistida por radiación con microondas  
 B) obtenido por el método de hidrodestilación.

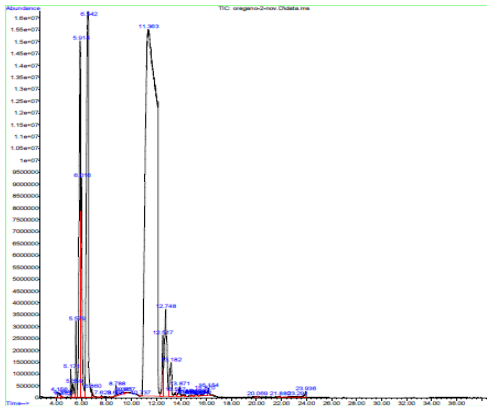


A

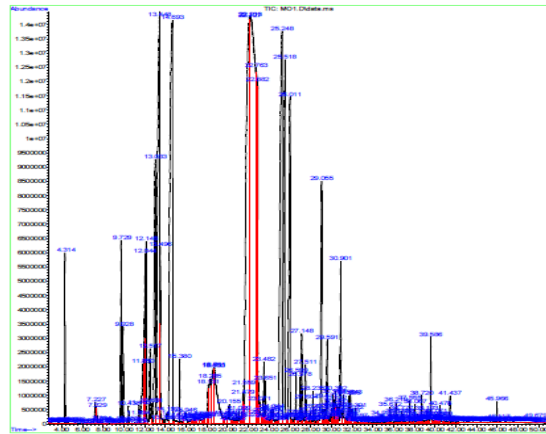


B

Perfil cromatográfico del aceite esencial de oreganito (*Lippia alba*): A) obtenido por el método de hidrodestilación asistida por radiación asistida con microondas. B) obtenido por el método de hidrodestilación.



A



B

Perfil cromatográfico del aceite esencial de Orégano (*Origanum vulgare*) A) obtenido por el método de hidrodestilación asistida por radiación asistida con microondas B) obtenido por el método de hidrodestilación.

## **ANEXO 3. CUANTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES COMPONENTES DE LOS ACEITES ESENCIALES**

Componentes principales cuantificados en el aceite esencial de *Origanum vulgare ssp* (orégano borde blanco) obtenido por el método de hidrodestilación asistida por radiación asistida con microondas

Número de pico	Componente	Tiempo de retención (Rt) Minutos	Concentración relativa (%)
1	p-Cimeno	5.957	2.31
2	γ -Terpineno	6.485	0.91
3	Citral	10.102	6.49
<b>4</b>	<b>Carvacrol</b>	<b>11.684</b>	<b>69.97</b>
5	Cariofileno	12.58	2.75
6	Timol	20.854	10.74

Componentes principales cuantificados en el aceite esencial de *Origanum vulgare ssp* (orégano borde blanco) obtenido por el método de hidrodestilación.

Número de pico	Componente	Tiempo de retención (Rt) Minutos	Concentración relativa (%)
1	α-pineno	9.957	0.59
2	o-cimeno	13.464	6.71
3	γ -Terpineno	14.709	6.25
4	Timol	(22.148	10.11
<b>5</b>	<b>Carvacrol</b>	<b>22.521</b>	<b>64.55</b>
6	Cariofileno	25.361	4.00

Componentes principales cuantificados en el aceite esencial de oreganito (*Lippia alba*) obtenido por el método de hidrodestilación asistida por radiación asistida con microondas

Número de pico	Componente	Tiempo de retención (Rt) Minutos	Concentración relativa (%)
1	α-Pineno	4.217	0.29
2	β-Mirceno	5.173	0.71
3	4-Careno	5.580	1.54



4	o-Cimeno	5.942	12.17
5	p-Cimeno	6.198	5.50
6	γ-Terpineno	6.575	12.07
<b>7</b>	<b>Carvacrol</b>	<b>11.383</b>	<b>44.74</b>
8	Eugenol	12.679	5.21
9	Cariofileno	12.762	4.38

Componentes principales cuantificados en el aceite esencial de oreganito (*Lippia alba*) obtenido por el método de hidrodestilación

Número de pico	Componente	Tiempo de retención (Rt) Minutos	Concentración relativa (%)
1	2-tujeno	9.714	0.10
2	β-mirceno	12.103	1.40
3	o-cimeno	13.438	3.05
4	Limoneno	13.508	0.55
5	α-Terpinen	14.479	1.49
6	Linalool	15.896	0.42
7	α-pineno	16.430	0.48
8	Terpinen-4-ol	18.129	0.19
9	α-Citral	20.522	5.24
10	α-Citral	20.973	1.47
<b>11</b>	<b>Carvacrol</b>	<b>22.616</b>	<b>0.14</b>
12	p-Menta	23.808	0.92

Componentes principales cuantificados en el aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) obtenido por el método de hidrodestilación asistida por radiación asistida con microondas

Número de pico	Componente	Tiempo de retención (Rt) Minutos	Concentración relativa (%)
1	β-Mirceno	5.173	0.40
2	α-Terpineno	5.580	0.95
3	p-Cimeno	5.912	8.51
4	Terpineno	6.545	13.43
<b>5</b>	<b>Carvacrol</b>	<b>11.360</b>	<b>65.01</b>

Componentes principales cuantificados en el aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) obtenido por el método de hidrodestilación.

Número de pico	Componente	Tiempo de retención (Rt) Minutos	Concentración relativa (%)
1	$\beta$ -pineno	11.461	1.39
2	<b>Carvacrol</b>	11.852	65.63
3	$\alpha$ -Terpineno	14.691	9.81
4	Terpinen-4-ol	18.710	1.86
5	Timol	22.764	13.77
6	Cariofileno	25.248	7.49

## **ANEXO 4. DATOS ENSAYOS ABTS, DPPH Y ORAC**

DETERMINACION IC50 DE Ácido ascórbico y Aceites esenciales por el método ABTS

Muestra	Concentración ppm	% de Captación de Radical ABTS				% de Captación de Radical ABTS			
Ácido ascórbico	1	32,426	27,337	26,913	25,923	26,147	20,445	20,167	22,114
	2	53,490	58,862	54,904		50,765	49,096	54,381	51,599
	4	93,214	92,649	92,508	93,214	93,602	92,629	92,350	93,185
	6	92,649	91,942	93,638	93,214	93,880	93,602	94,019	94,019
Oreganito ( <i>Lippia alba mill</i> ) HDM	125	28,244	29,688	24,346	27,089	24,944	27,017	25,093	25,241
	250	29,255	33,297	31,998	25,934	34,863	37,528	36,788	45,670
	500	39,650	32,720	34,308	41,382	41,525	42,413	41,673	42,117
	750	45,281	45,425	39,939	34,308	48,779	45,374	48,038	41,377
	1000	48,168	48,890	52,500	49,756	68,320	46,262	45,522	46,558
	2000	60,729	54,954	56,542	52,355	56,181	52,924	52,924	50,259
	3000	65,205	60,440	61,307	62,029	57,957	56,921	58,401	57,957
	4000	67,371	64,050	65,060	64,627	62,842	60,178	64,027	58,993
	5000	68,381	69,392	67,226	69,825	65,359	63,731	63,434	64,471
	6000	69,392	71,124	70,258	67,371	68,616	67,876	68,172	67,135
AE Origanum Vulgaris HDM	12,5	41,989	40,470	33,840	33,149	40,627	40,627	38,955	38,537
	25	50,552	49,862	53,039	50,414	55,819	53,589	52,195	55,122
	50	58,149	57,735	51,243	56,906	61,951	62,509	62,648	62,091
	75	65,055	62,017	61,326	62,845	67,944	67,247	66,969	65,993
	100	65,055	66,575	64,365	65,608	69,059	70,035	70,732	69,199
	125	69,061	64,641	67,265	68,094	72,962	70,174	71,150	69,338
	150	71,547	70,028	70,856	69,613	72,265	71,707	71,847	74,077
	200	72,099	72,376	71,271	73,619	75,331	74,634	75,610	70,592
	250	73,619	72,238	69,199	69,199	75,610	75,470	75,470	75,052
	300	72,238	71,961	73,757	73,343	76,446	76,725	76,864	75,610

AE <i>Origanum Vulgaris</i> HD	12,5	31,906	35,221	29,972	32,182	33,659	36,446	32,822	34,077
	25	39,365	38,536	40,746	41,851	40,627	41,603	43,275	44,390
	50	50,967	48,757	47,652	48,757	50,801	52,056	49,547	49,547
	75	53,591	52,486	53,729	54,696	56,516	54,007	57,213	58,049
	100	60,359	59,116	56,492	56,768	62,787	62,787	60,557	61,672
	125	60,497	59,254	62,983	61,188	64,460	63,902	63,624	62,509
	150	65,746	64,503	62,017	64,779	69,338	68,780	67,526	67,666
	200	68,923	67,956	70,442	69,337	72,962	72,265	70,035	71,707
	250	72,790	72,928	70,028	71,685	76,028	76,307	76,028	76,307
	300	75,829	74,862	74,862	74,724	79,652	77,282	78,118	78,676
AE Oreganito ( <i>Lippia alba mill</i> ) HD	250	30,698	25,934	26,656	28,100	21,244	21,540	18,283	20,207
	500	38,062	34,597	34,452	30,265	31,014	28,942	32,050	27,905
	1000	44,559	42,537	41,382	42,537	37,232	36,491	35,159	33,087
	2000	54,954	52,355	50,911	55,820	47,150	45,078	47,446	44,486
	3000	63,472	61,451	60,152	62,606	57,217	54,552	53,812	54,996
	4000	66,071	64,916	65,782	64,339	63,138	63,731	62,990	61,954
	5000	74,589	73,290	71,124	71,991	71,132	68,024	67,432	68,616
	6000	77,766	74,445	74,734	76,322	73,649	71,725	72,021	69,504
	7000	79,065	77,910	77,910	78,055	76,018	76,166	73,353	74,241
	8000	81,664	81,231	82,241	82,819	79,275	78,979	79,275	77,054
AE <i>Origanum vulgare</i> ssp (orégano borde blanco) HDM	12,5		38,187	35,539	36,334		35,132	38,605	32,899
	25	47,981	48,511	54,864	53,408	43,194	47,163	49,271	44,682
	50	63,865	62,541	60,556	58,306	54,729	56,217	55,225	54,109
	75	65,983	64,659	65,983	64,130	62,171	59,566	61,178	62,171
	100	68,498	66,909	66,380	64,924	63,287	61,674	62,791	62,543
	125	70,218	69,292	69,424	66,909	66,016	65,891	68,620	66,760
	150	73,395	69,821	66,777	69,821	69,984	68,496	66,760	69,116

AE <i>Origanum vulgare</i> ssp (orégano borde blanco) HD	200	71,277	72,336	70,218	68,895	71,349	71,969	72,961	72,465
	250	75,645	75,248	72,601	72,733	73,705	73,457	72,589	72,837
	300	75,248	69,954	74,983	71,277	74,698	74,822	75,318	72,217
	12,5	34,083	42,555	37,922	31,568	37,240	40,713	41,457	41,829
	25	50,232	46,261	52,085	45,467	53,612	52,124	53,240	50,140
	50	56,717	57,247	58,438	54,467	60,930	60,558	59,938	59,194
	75	65,718	61,482	64,924	62,409	66,512	65,271	66,884	65,271
	100	68,233	68,101	68,895	65,056	67,008	69,612	67,752	68,992
	125	72,866	70,086	71,145	69,159	73,209	71,721	72,465	70,977
	150	71,145	72,071	70,748	71,277	71,969	74,326	71,721	73,705
	200	68,498	66,512	68,498	66,380	68,372	67,504	69,736	68,372
	250	69,424	68,762	68,365	67,571	71,349	70,729	70,481	69,984
	300	70,880	69,821	71,145	69,557	72,589	71,845	73,209	72,093

Muestra	CI50 (µg/mL)	Limites Confianza (µg/mL)
A. ascórbico	2,09	(1,13-2,98)
AE oreganito ( <i>Lippia alba mill</i> ) HDM	1153,04	(1020,51-1298,32)
AE <i>Origanum Vulgare</i> HDM	24,23	(22,56-26,08)
AE <i>Origanum Vulgare</i> HD	53,58	(51,03-56,25)
AE oreganito ( <i>Lippia alba mill</i> ) HD	1971,89	(1847,99-2102,59)
AE <i>Origanum vulgare</i> ssp (orégano borde) HDM	29,08	(27,18-31,15)
AE <i>Origanum vulgare</i> ssp (orégano borde blanco) HD	23,97	(22,24-25,93)

AE *Origanum vulgare* ssp (oregano borde blanco) HD

MEJOR ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

**DETERMINACION IC50 DE Ácido ascórbico y Aceites esenciales por el método DPPH**

Muestra	Concentración ppm	% de Captación de Radical DPPH				% de Captación de Radical DPPH			
Ácido ascórbico	1	7,14	4,89	7,62		-5,034	-3,101	-2,859	
	5	10,61	15,71	22,47	18,44	10,068	9,948	11,277	
	10	23,08	24,14	23,43		22,191	23,157	20,379	
	15	70,99	74,31	73,24		70,701	72,634	71,063	70,459
	20	97,83	97,71	97,47		97,584	97,463	96,738	
AE Ooreganito ( <i>Lippia alba mill</i> ) HD	500	19,536	12,705	11,066	14,617	18,996	18,864	18,203	17,542
	1000	26,776	25,546	32,514	28,415	29,699	29,567	34,721	30,889
	2000	46,311	41,393	39,754	41,667	47,803	46,085	45,425	45,557
	2500	46,977	44,938	44,064	46,249	46,935	43,507	41,569	41,271
	3000	45,666	44,938	49,599	46,103	45,593	44,103	47,978	45,743
	3500	51,784	48,288	46,249	46,832	48,277	46,339	43,358	44,848
	4000	50,619	50,910	53,678	51,202	48,277	47,680	52,152	50,363
	5000	60,167	57,396	56,011	59,013	56,071	53,195	51,365	51,234
	7500	66,864	66,633	68,711	68,480	59,209	59,340	60,255	59,601
	10000	70,212	67,095	67,903	68,711	66,661	62,739	62,216	62,347
AE <i>Origanum Vulgaris</i> HDM	62,5	15,741	9,744	8,053	8,053	16,230	10,742	10,164	10,164
	125	24,813	23,121	22,045	30,655	26,918	24,174	31,396	
	250	44,647	42,495	38,805	39,727	46,272	42,228	39,339	39,484
	375	51,413	49,721	54,949	56,948	54,793	50,172	56,960	62,159
	500	66,934	62,272	59,796	60,961	63,630	60,648	56,624	58,114
	1000	74,800	73,926	76,839	74,800	73,617	72,871	76,151	73,169

	2000	85,433	83,685	83,394	83,540	84,200	83,156	82,411	82,858
--	------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------

Muestra	Concentración ppm	% de Captación de Radical DPPH				% de Captación de Radical DPPH			
AE <i>Origanum Vulgaris</i> HD	62,5	29,060	25,710	21,631	23,962	27,110	27,110	20,253	19,508
	125	42,316	42,607	47,706	44,355	39,184	39,184	44,550	40,674
	250	66,642	61,981	59,650	59,942	61,394	61,394	58,413	59,605
	375	71,012	70,721	73,489	70,867	70,933	70,933	73,020	70,188
	500	70,219	71,995	77,049	75,820	78,461	78,461	79,650	78,328
	1000	86,202	84,426	83,607	84,290	87,578	86,653	86,521	86,521
	2000	88,934	88,388	89,617	88,798	90,618	90,089	91,146	90,882
AE <i>Origanum vulgaris</i> ssp (orégano borde) HDM	500	1,913	-3,825	-6,694	-2,596	4,602	1,919	-4,490	-0,466
	1000	10,124	9,104	13,911	9,687	6,838	3,857	13,248	6,242
	2000	21,995	16,667	12,842	17,896	28,510	25,471	22,431	23,092
	3000	25,127	23,379	29,643	24,253	23,086	21,744	27,706	23,682
	4000	35,324	30,080	27,312	26,147	28,452	24,725	19,359	22,191
	5000	30,954	29,352	35,033	31,391	26,216	24,576	32,029	27,408
	7500	45,521	42,170	39,840	39,840	41,867	39,333	35,010	37,395
	10000	46,249	44,355	48,580	45,375	43,954	41,420	47,382	44,252
AE <i>Origanum vulgaris</i> ssp (orégano borde blanca) HD	62,5	28,766	24,551	22,065	22,173	26,443	23,727	21,336	21,771
	125	34,495	32,874	37,954	39,900	40,676	34,049	37,525	34,375
	250	54,493	51,574	49,953	49,520	51,650	50,455	48,065	48,717
	375	57,735	56,222	60,113	61,951	63,276	57,083	60,234	56,648
	500	62,592	63,285	67,095	65,709	60,386	60,124	62,347	61,170
	1000	79,680	77,717	77,255	77,601	77,905	76,205	74,767	75,290
	2000	86,261	86,376	87,415	87,184	84,965	84,834	85,880	85,096



Muestra	concentracion ppm	% de Captacion de Radical DPPH				% de Captacion de Radical DPPH			
AE <i>Origanum vulgare</i> ssp (orégano borde blanco) HDM	62,5	26,280	23,254	20,227	21,200	23,944	21,010	18,403	19,707
	125	32,550	30,820	35,144	37,954	41,546	30,680	35,244	31,550
	250	41,197	38,387	36,225	36,441	39,698	37,200	34,483	35,896
	375	52,331	50,709	54,709	56,546	58,821	50,998	54,801	51,433
	500	60,976	58,897	56,126	59,128	55,418	53,849	51,365	52,541
	1000	74,253	73,676	75,870	74,830	68,492	69,407	71,499	70,976
	2000	84,182	82,566	81,873	83,259	82,873	81,173	80,650	81,173

	Muestra						
CI50 (µg/mL)	A. ascorbico	Aceite E. 1	Aceite E. 2	Aceite E. 3	Aceite E. 4	Aceite E. 5	Aceite E. 6
1 CI <sub>50</sub>	13,02	3763,0	339,5	165	*	235,7	329,8
2 CI <sub>50</sub>	13,11	4013,0	322	188,6	*	244,9	325,1
<b>Prom</b>	13,065	3888,0	330,8	176,8		240,3	327,5
<b>SD</b>	0,064	176,777	12,374	16,688	#iDIV/0!	6,505	3,323
<b>n</b>	2,000	2,000	2,000	2,000	#iDIV/0!	2,000	2,000
<b>ESM</b>	0,045	125,000	8,750	11,800	#iDIV/0!	4,600	2,350
<b>CV</b>	0,487	4,547	3,741	9,439	#iDIV/0!	2,707	1,015

Muestra	CI50 ( $\mu\text{g/mL}$ ) $\pm$ E.S.M.	Limites Confianza ( $\mu\text{g/mL}$ )
A. ascórbico	13,065 $\pm$ 0,045	(12,02-14,07)
AE Oreganito ( <i>Lippia alba mill</i> ) HD	3888 $\pm$ 125	(3248,46- 3641,15)
AE <i>Origanum Vulgaris</i> HDM	330,8 $\pm$ 8,75	(309,37-339,08)
AE <i>Origanum Vulgaris</i> HD	176 $\pm$ 11,8	(153,46-166,09)
AE <i>Origanum vulgare</i> ssp (orégano borde blanco) HDM	*	*
AE <i>Origanum vulgare</i> ssp (orégano borde blanco) HD	240,3 $\pm$ 4,6	(241,14-262,85)
AE <i>Origanum vulgare</i> ssp (orégano borde blanco) HDM	327,5 $\pm$ 2,35	(336,74-389,04)

AE *Origanum Vulgaris* HD

MEJOR ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

## **ANEXO 5. DATOS ANOVA DEL LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

Table Analyzed	Data 1				
One-way analysis of variance					
P value	P<0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	14				
F	6577				
R squared	0,9998				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	193800000	13	14910000		
Residual (within columns)	31730	14	2267		
Total	193800000	27			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
A.A. vs AE O. (HD)	-9987	296,7	Yes	***	-10180 to -9797
A.A. vs AE O. (HDM)	-3875	115,1	Yes	***	-4065 to -3685
A.A. vs AE O. V. (HD)	-163,7	4,864	No	ns	-353.5 to 26.03
A.A. vs AE O. V. (HDM)	-317,7	9,437	Yes	***	-507.4 to -127.9
A.A. vs AE O.B. (HD)	-314,0	9,327	Yes	***	-503.7 to -124.2
A.A. vs AE O. B. (HDM)	-227,2	6,750	Yes	*	-417.0 to -37.47
A.A. vs A.A.	10,98	0,3260	No	ns	-178.8 to 200.7
A.A. vs AE O. (HD)	-1959	58,19	Yes	***	-2149 to -1769
A.A. vs AE O. (HDM)	-1140	33,86	Yes	***	-1330 to -950.2
A.A. vs AE O. V. (HD)	-40,52	1,204	No	ns	-230.3 to 149.2
A.A. vs AE O. V. (HDM)	-11,17	0,3317	No	ns	-200.9 to 178.6
A.A. vs AE O.B. (HD)	-10,91	0,3239	No	ns	-200.7 to 178.9
A.A. vs AE O. B. (HDM)	-16,02	0,4757	No	ns	-205.8 to 173.7
AE O. (HD) vs AE O. (HDM)	6112	181,6	Yes	***	5922 to 6302
AE O. (HD) vs AE O. V. (HD)	9823	291,8	Yes	***	9633 to 10010
AE O. (HD) vs AE O. V. (HDM)	9669	287,2	Yes	***	9479 to 9859
AE O. (HD) vs AE O.B. (HD)	9673	287,3	Yes	***	9483 to 9863

AE O. (HD) vs AE O. B. (HDM)	9760	289,9	Yes	***	9570 to 9949
AE O. (HD) vs A.A.	9998	297,0	Yes	***	9808 to 10190
AE O. (HD) vs AE O. (HD)	8028	238,5	Yes	***	7838 to 8218
AE O. (HD) vs AE O. (HDM)	8847	262,8	Yes	***	8657 to 9037
AE O. (HD) vs AE O. V. (HD)	9946	295,5	Yes	***	9757 to 10140
AE O. (HD) vs AE O. V. (HDM)	9976	296,3	Yes	***	9786 to 10170
AE O. (HD) vs AE O.B. (HD)	9976	296,3	Yes	***	9786 to 10170
AE O. (HD) vs AE O. B. (HDM)	9971	296,2	Yes	***	9781 to 10160
AE O. (HDM) vs AE O. V. (HD)	3711	110,2	Yes	***	3521 to 3901
AE O. (HDM) vs AE O. V. (HDM)	3557	105,7	Yes	***	3367 to 3747
AE O. (HDM) vs AE O.B. (HD)	3561	105,8	Yes	***	3371 to 3751
AE O. (HDM) vs AE O. B. (HDM)	3648	108,4	Yes	***	3458 to 3837
AE O. (HDM) vs A.A.	3886	115,4	Yes	***	3696 to 4076
AE O. (HDM) vs AE O. (HD)	1916	56,92	Yes	***	1726 to 2106
AE O. (HDM) vs AE O. (HDM)	2735	81,24	Yes	***	2545 to 2925
AE O. (HDM) vs AE O. V. (HD)	3834	113,9	Yes	***	3645 to 4024
AE O. (HDM) vs AE O. V. (HDM)	3864	114,8	Yes	***	3674 to 4054
AE O. (HDM) vs AE O.B. (HD)	3864	114,8	Yes	***	3674 to 4054
AE O. (HDM) vs AE O. B. (HDM)	3859	114,6	Yes	***	3669 to 4049
AE O. V. (HD) vs AE O. V. (HDM)	-154,0	4,573	No	ns	-343.7 to 35.81
AE O. V. (HD) vs AE O.B. (HD)	-150,3	4,463	No	ns	-340.0 to 39.51
AE O. V. (HD) vs AE O. B. (HDM)	-63,50	1,886	No	ns	-253.3 to 126.3
AE O. V. (HD) vs A.A.	174,7	5,190	No	ns	-15.05 to 364.5
AE O. V. (HD) vs AE O. (HD)	-1795	53,32	Yes	***	-1985 to -1605
AE O. V. (HD) vs AE O. (HDM)	-976,2	29,00	Yes	***	-1166 to -786.5
AE O. V. (HD) vs AE O. V. (HD)	123,2	3,660	No	ns	-66.54 to 313.0
AE O. V. (HD) vs AE O. V. (HDM)	152,6	4,532	No	ns	-37.19 to 342.3
AE O. V. (HD) vs AE O.B. (HD)	152,8	4,540	No	ns	-36.93 to 342.6
AE O. V. (HD) vs AE O. B. (HDM)	147,7	4,388	No	ns	-42.04 to 337.5
AE O. V. (HDM) vs AE O.B. (HD)	3,700	0,1099	No	ns	-186.1 to 193.5
AE O. V. (HDM) vs AE O. B. (HDM)	90,45	2,687	No	ns	-99.31 to 280.2
AE O. V. (HDM) vs A.A.	328,7	9,763	Yes	***	138.9 to 518.4
AE O. V. (HDM) vs AE O. (HD)	-1641	48,75	Yes	***	-1831 to -1451
AE O. V. (HDM) vs AE O. (HDM)	-822,3	24,43	Yes	***	-1012 to -632.5

AE O. V. (HDM) vs AE O. V. (HD)	277,2	8,233	Yes	**	87.41 to 466.9
AE O. V. (HDM) vs AE O. V. (HDM)	306,5	9,105	Yes	***	116.8 to 496.3
AE O. V. (HDM) vs AE O.B. (HD)	306,8	9,113	Yes	***	117.0 to 496.5
AE O. V. (HDM) vs AE O. B. (HDM)	301,7	8,961	Yes	***	111.9 to 491.4
AE O.B. (HD) vs AE O. B. (HDM)	86,75	2,577	No	ns	-103.0 to 276.5
AE O.B. (HD) vs A.A.	325,0	9,653	Yes	***	135.2 to 514.7
AE O.B. (HD) vs AE O. (HD)	-1645	48,86	Yes	***	-1835 to -1455
AE O.B. (HD) vs AE O. (HDM)	-826,0	24,54	Yes	***	-1016 to -636.2
AE O.B. (HD) vs AE O. V. (HD)	273,5	8,123	Yes	**	83.71 to 463.2
AE O.B. (HD) vs AE O. V. (HDM)	302,8	8,995	Yes	***	113.1 to 492.6
AE O.B. (HD) vs AE O.B. (HD)	303,1	9,003	Yes	***	113.3 to 492.8
AE O.B. (HD) vs AE O. B. (HDM)	298,0	8,851	Yes	**	108.2 to 487.7
AE O. B. (HDM) vs A.A.	238,2	7,076	Yes	**	48.45 to 428.0
AE O. B. (HDM) vs AE O. (HD)	-1732	51,44	Yes	***	-1921 to -1542
AE O. B. (HDM) vs AE O. (HDM)	-912,7	27,11	Yes	***	-1103 to -723.0
AE O. B. (HDM) vs AE O. V. (HD)	186,7	5,547	No	ns	-3.044 to 376.5
AE O. B. (HDM) vs AE O. V. (HDM)	216,1	6,418	Yes	*	26.31 to 405.8
AE O. B. (HDM) vs AE O.B. (HD)	216,3	6,426	Yes	*	26.57 to 406.1
AE O. B. (HDM) vs AE O. B. (HDM)	211,2	6,274	Yes	*	21.46 to 401.0
A.A. vs AE O. (HD)	-1970	58,51	Yes	***	-2160 to -1780
A.A. vs AE O. (HDM)	-1151	34,19	Yes	***	-1341 to -961.2
A.A. vs AE O. V. (HD)	-51,49	1,530	No	ns	-241.3 to 138.3
A.A. vs AE O. V. (HDM)	-22,14	0,6577	No	ns	-211.9 to 167.6
A.A. vs AE O.B. (HD)	-21,88	0,6500	No	ns	-211.6 to 167.9
A.A. vs AE O. B. (HDM)	-26,99	0,8017	No	ns	-216.8 to 162.8
AE O. (HD) vs AE O. (HDM)	818,9	24,32	Yes	***	629.1 to 1009
AE O. (HD) vs AE O. V. (HD)	1918	56,98	Yes	***	1729 to 2108
AE O. (HD) vs AE O. V. (HDM)	1948	57,86	Yes	***	1758 to 2137
AE O. (HD) vs AE O.B. (HD)	1948	57,86	Yes	***	1758 to 2138
AE O. (HD) vs AE O. B. (HDM)	1943	57,71	Yes	***	1753 to 2133
AE O. (HDM) vs AE O. V. (HD)	1099	32,66	Yes	***	909.7 to 1289
AE O. (HDM) vs AE O. V. (HDM)	1129	33,53	Yes	***	939.0 to 1319
AE O. (HDM) vs AE O.B. (HD)	1129	33,54	Yes	***	939.3 to 1319
AE O. (HDM) vs AE O. B. (HDM)	1124	33,39	Yes	***	934.2 to 1314

AE O. V. (HD) vs AE O. V. (HDM)	29,35	0,8718	No	ns	-160.4 to 219.1
AE O. V. (HD) vs AE O.B. (HD)	29,61	0,8796	No	ns	-160.2 to 219.4
AE O. V. (HD) vs AE O. B. (HDM)	24,50	0,7278	No	ns	-165.3 to 214.3
AE O. V. (HDM) vs AE O.B. (HD)	0,2600	0,007723	No	ns	-189.5 to 190.0
AE O. V. (HDM) vs AE O. B. (HDM)	-4,850	0,1441	No	ns	-194.6 to 184.9
AE O.B. (HD) vs AE O. B. (HDM)	-5,110	0,1518	No	ns	-194.9 to 184.7

**ANEXO 6. CAMBIOS EN EL ÍNDICE TBAR DEL ACEITE DE  
PALMA CRUDO, CONTENIENDO DIFERENTES CANTIDADES  
DE AE OBTENIDO POR DH Y HDM, Y ALMACENADO A 63 °C  
DURANTE 18 DÍAS**



Cambios en el índice TBAR del aceite de palma crudo, conteniendo diferentes cantidades de AE obtenido por DH y almacenado a 63 °C durante 18 días. Aceite esencial de oreganito (*Lippia alba mill*); orégano (*Orégano vulgare*) Orégano borde blanca (*Orégano vulgare ssp*), aceite crudo sin aditivo; y aceite crudo con ácido ascórbico.

PARAMETROS	INDICE DE TBA, mg de malonaldehido/Kg				
MUESTRA	ACEITE DE PALMA CRUDO + OREGANITO ( <i>Lippia alba mill</i> ) HD				
CONCENTRACION DE OREGANITO, ppm	150	250	350	450	600
DIAS					
0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0
12	50	25	25	0	0
15	125	100	50	25	0
18	200	105	100	100	0

PARAMETROS	INDICE DE TBA, mg de malonaldehido/Kg				
MUESTRA	ACEITE DE PALMA CRUDO + AE OREGANO ( <i>Orégano vulgare</i> ) HD				
CONCENTRACION DE AE OREGANO, ppm	150	250	350	450	600
DIAS					
0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0
15	25	10	0	0	0
18	60	45	0	0	0

PARAMETROS	INDICE DE TBA, mg de malonaldehido/Kg				
MUESTRA	ACEITE DE PALMA CRUDO + AE OREGANO BORDE BLANCO ( <i>Orégano vulgare</i> ) HD				
CONCENTRACION DE AE OREGANO OB, ppm	150	250	350	450	600
DIAS					
0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0
12	40	0	0	0	0
15	80	25	0	0	0
18	95	70	50	0	0

Cambios en el índice TBAR del aceite de palma crudo, conteniendo diferentes cantidades de AE obtenido por DHM y almacenado a 63 °C durante 18 días. Aceite esencial de oreganito (*Lippia alba mill*); orégano (*Orégano vulgare*) Orégano borde blanca (*Orégano vulgare ssp*), aceite crudo sin aditivo; y aceite crudo con ácido ascórbico.

PARAMETROS	INDICE DE TBA, mg de malonaldehido/Kg				
MUESTRA	ACEITE DE PALMA CRUDO + AE OREGANITO ( <i>Lippia alba mill</i> ) HDM				
CONCENTRACION DE AE OREGANITO MO,ppm	150	250	350	450	600
DIAS					
0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0
12	35	0	0	0	0
15	45	30	0	0	0
18	100	70	0	0	0

PARAMETROS	INDICE DE TBA, mg de malonaldehido/Kg				
MUESTRA	ACEITE DE PALMA CRUDO + AE OREGANO ( <i>Orégano vulgare</i> ) HDM				
CONCENTRACION DE AE OREGANO MO,ppm	150	250	350	450	600
DIAS					
0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0
15	10	0	0	0	0
18	40	30	20	0	0

PARAMETROS	INDICE DE TBA, mg de malonaldehido/Kg				
MUESTRA	ACEITE DE PALMA CRUDO + AE OB ( <i>Orégano vulgare ssp</i> ) HDM				
CONCENTRACION DE AE OB MO, ppm	150	250	350	450	600
DIAS					
0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0
18	20	0	0	0	0

PARAMETROS		INDICE DE TBA, mg de malonaldehido/Kg	
MUESTRA		ACEITE DE PALMA CRUDO	ACEITE DE PALMA - ACIDO ASCORBICO AL 0.02%
<b>DIAS</b>			
<b>0</b>		0	0
<b>3</b>		0	0
<b>6</b>		0	0
<b>9</b>		55	0
<b>12</b>		80	0
<b>15</b>		155	0
<b>18</b>		340	0