UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

El orégano de monte (*Lippia origanoides*) del Alto Patía: Efecto del método de obtención de sus extractos sobre la composición y la actividad antioxidante de los mismos

Diana Rocío Vásquez Carreño

Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá
Facultad de Ciencias
Departamento de Química
Maestría en Ciencias Químicas
Bogotá D.C., Colombia
2012

El orégano de monte (*Lippia origanoides*) del Alto Patía: Efecto del método de obtención de sus extractos sobre la composición y la actividad antioxidante de los mismos

Diana Rocío Vásquez Carreño

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Química

Director:

Químico, Dr Sc. Fabian Parada Alfonso

Codirectora:

Química, MSc Bioquímica, Ph.D. agricultura. Olga Lucia Mayorga

Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá

Facultad de Ciencias

Departamento de Química

Maestría en Ciencias Químicas

Bogotá D.C., Colombia

2012

A Dios, por su misericordia y por darme la sabiduría, fuerza y paciencia en la culminación de este trabajo y de esta etapa de mi vida.

A mis padres por sus enseñanzas y apoyo moral.

A mis hermanas por su apoyo incondicional.
A los dos amores de mi vida Gabriela y Santiago y a su nana Magdalena por su infinita paciencia y comprensión.

Agradecimientos

A CORPOICA y al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural por la financiación del proyecto “ESTRATEGIA PARA UTILIZAR ACEITES ESENCIALES DE OREGANO NATIVO DEL ALTO PATIA COMO ADITIVO NUTRACÉUTICO EN CICLOS COMERCIALES DE PRODUCCIÓN DE POLLO DE ENGORDE Y PONEDORAS”.

A la Universidad Nacional de Colombia, donde me he formado como una profesional integral.

De manera especial a la Doctora Claudia Janeth Ariza Nieto de CORPOICA por la oportunidad que me dió de continuar con mi formación profesional y por su apoyo incondicional.

A mi Director Fabian Parada Alfonso y Codirectora Olga Lucía Mayorga que me impartieron valiosas enseñanzas a lo largo de la maestría.

A los profesores Luis Enrique Cuca y Wilman Delgado, así como a todos los integrantes del grupo de investigación de Productos Naturales Vegetales, por permitirme acceder al conocimiento que aprendí allí y por permitirme llevar a cabo parte de este estudio.

Al Laboratorio de Frutas Tropicales y al Laboratorio de Altas Presiones y especialmente a la profesora Luz Patricia Restrepo. A mis compañeros en el laboratorio Alejandro Bourdon, Henry Castro y Angela González por su inmensa colaboración, por tener siempre una respuesta a todas mis dudas e inquietudes y por los aportes realizados.

A mis compañeros de CORPOICA, Alipio, Karen, Doris, Rocío, Angela Patricia, Sandra y Daniel por su inmensa e incondicional amistad. A Yesid Avellaneda y Ronnal Ortiz por su gran ayuda en todo el análisis estadístico.

A los profesores Leonardo Castellanos y Coralia Osorio por sus aportes y críticas constructivas al presente trabajo.

Y a todos aquellos que de una u otra manera contribuyeron a la realización de este trabajo.

Resumen

Los aceites esenciales de orégano (AEO) presentan alta actividad antioxidante y ésta ha sido asociada a su composición. En este estudio se comparó la composición y actividad antioxidante de los AEO de *L. origanoides* nativo del Alto Patía obtenidos por arrastre con vapor (AV), hidrodestilación (HD) y extracción con fluidos supercríticos (EFS). La actividad antioxidante fue evaluada mediante las técnicas de actividad antiradicalaria (DPPH), el poder de reducción del hierro (FRAP), la capacidad de absorbancia del radical oxígeno (ORAC), el blanqueamiento del β-caroteno (BET); adicionalmente se determinó el contenido total de fenoles (CTF). La cantidad relativa de los componentes fue caracterizada por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). La composición de los AEO del Alto Patia fue afectada significativamente por el método de extracción y consecuentemente su capacidad antioxidante ($p \leq 0,001$), siendo el extracto de fluidos supercríticos a 110 bares y 60°C el de mayor capacidad antioxidante con cantidades relativas de 99,99% en timol, seguido por AV con un 64,3 % en timol, 5,6% en ρ-cimeno y 5,3% en trans-β-cariofileno; en tanto que el de menor actividad fue el HD con 60,8% de timol, 9,2% en ρ-cimeno y 5,4% en acetato de timilo; lo cual indica que la actividad del AE de *Lippia origanoides* del Alto Patía está relacionada con su alto contenido en timol. El extracto AEO obtenido por hidrodestilación fue incluido en una dieta para ponedoras a una concentración de 200 ppm, seguido de la evaluación de la estabilidad oxidativa de los huevos frescos y almacenados a 4 °C y -10 °C por seis meses. En este ensayo se observó que hay un efecto benéfico la suplementación de AEO a la temperatura de 4 °C, en comparación con los huevos almacenados a -10 °C que no presentó un efecto significativo en la oxidación lipídica de los mismos. La inclusión de los AEO en dietas para ponedoras disminuyó la oxidación lipídica en huevos demostrando su efecto como aditivo funcional en sistemas de producción pecuaria.

Palabras clave: Aceite esencial, *Lippia origanoides,* arrastre con vapor, hidrodestilación, extracción con fluidos supercríticos, actividad antioxidante, composición.

Abstract

The oregano essential oil (OEO) has presented a high antioxidant activity which has been associated with their chemical composition. This study aimed to compare the composition of a native EO *L. Origanoides* from the Alto Patia, obtained by steam destillation (AV), hydrodestillation (HD) and supercritical fluids extraction (SFE). The antioxidant activity

was evaluated using the techniques, antiradicalary activity using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), ferric reducing antioxidant power (FRAP), oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and the β-carotene bleaching method; additionally was determined the total phenol content (TPC). The components in terms of relative amounts were characterized by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). The composition of OEO from Alto Patia were significantly affected by extraction method ; consequently their antioxidant capacity was also affected ($p \leq 0.001$), being the SFE (obtain at 110 bars and 60°C) the highest antioxidant capacity with relatives amounts of 99.99% in thymol , followed by AV with 64.3% in thymol, 5.6% in ρ-cymene and 5.3% in trans-β-caryophyllene; while the lowest activity was obtained by HD with 60.8% in thymol , 9.2% in ρ-cymene and 5.4% in thymyl acetate. The above results indicate that the activity of *L. origanoides* from Alto Patia is related with its high content in thymol. The OEO extract obtained by hydrodistillation was included in a diet for layers at a concentration of 200 ppm, followed by evaluation of oxidative stability of fresh eggs and stored at 4 °C and -10 °C for six months. In this assay there was observed a beneficial effect of supplementation of OEO at temperature of 4 °C, compared to eggs stored at -10 °C showed not present a significant effect on lipid oxidation of the same. The inclusion of OEO in diets for laying hens decreased lipid oxidation in eggs showing its effect as a functional additive in livestock production systems.

Key words: Essential oil, *Lippia origanoides*, steam destillation, hydrodestillation, supercritical fluid extraction, antioxidant activity, composition.

Contenido

Pág.

Resumen ..... **IX**

Lista de figuras ..... **XIV**

Lista de tablas ..... **XVII**

Lista de abreviaturas y acrónimos ..... **XVII**

Introducción **1**

1. Estado actual del tema **3**
1.1 El orégano 3
1.1.1 Composición química de los aceites esenciales del orégano 4
1.1.2 Actividad biológica de los componentes del orégano…….. ……7
1.2 Características generales de *Lippia origanoides*……...8
1.3 Extracción de aceites esenciales …… ……11
1.3.1 Destilación por arrastre con vapor 11
1.3.2 Extracción por hidrodestilación 12
1.3.3 Extracción con fluidos supercríticos 13
1.4 Evaluación de la actividad antioxidante de los aceites esenciales y contenido total de fenoles 15
1.4.1 Métodos basados por Transferencia electrónica única 15
1.4.1.1 DPPH (Ensayo actividad antiradicalaria) 16
1.4.1.2 FRAP (Poder antioxidante / Reducción de hierro) 17
1.4.2 Método basado en Transferencia de átomos de hidrógeno 17
1.4.2.1 Ensayo blanqueamiento β-caroteno 18
1.4.2.2 ORAC (Capacidad de absorbancia del radical oxígeno) 19
1.4.3 Contenido total de fenoles (Folin Ciocalteu) 20

2. Objetivos **21**
2.1 Objetivo general 21
2.2 Objetivos especificos 21

3. Metodología **23**
3.1 Material vegetal 23
3.2 Métodos de obtención del aceite esencial 26

3.2.1 Extracción por arrastre con vapor 26
3.2.2 Extracción por hidrodestilación 26
3.2.3 Extracción con fluido supercrítico (EFS) 27
3.3 Caracterización química del aceite esencial y fraccionamiento 29
3.3.1 Cromatografia de gases – espectrometria de masas 29
3.3.2 Fraccionamiento del aceite esencial 30
3.4 Evaluación de la actividad antioxidantede los aceites esenciales de *Lippia origanoides* in condiciones *in vitro* 30
3.4.1 Ensayo actividad antiradicalaria DPPH 31
3.4.2 Evaluación del poder de reducción FRAP 31
3.4.3 Ensayo de la capacidad de absorbancia del radical oxígeno (ORAC) . 31
3.4.4 Ensayo blanqueamiento del β-caroteno (BET) 32
3.5 Contenido total de fenoles 33
3.6 Análisis estadístico 33
3.7 Aplicación promisoria del AEO 34
3.7.1 Animales y dieta 34
3.7.2 Recolección de muestras 37
3.7.3 Determinación de la oxidación lipídica mediante el análisis de substancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) 37
3.7.4 Análisis estadístico 38

4. Resultados y Discusión 39
4.1 Rendimientos de los extractos de *L. origanoides* obtenidos por diferentes métodos de extracción 39
4.2 Caracterización química de los extractos obtenidos 40
4.3 Actividad antioxidante y contenido total de fenoles 46
4.3.1 Ensayo actividad antiradicalaria DPPH 47
4.3.2 Evaluación del poder de reducción FRAP 48
4.3.3 Ensayo de la capacidad de absorbancia del radical oxígeno ORAC 50
4.3.4 Ensayo blanqueamiento β-caroteno 51
4.3.5 Contenido total de fenoles 52
4.4 Fraccionamiento y caracterización química 54
4.5 Actividad antioxidante y contenido total de fenoles de las fracciones del aceite esencial de *Lippia origanoides* Kunth 57
4.5.1 Ensayo actividad antiradicalaria DPPH 57
4.5.2 Evaluación del poder de reducción FRAP 58
4.5.3 Ensayo de la capacidad de absorbancia del radical oxígeno ORAC 59
4.5.4 Ensayo blanqueamiento β-caroteno 60
4.5.5 Contenido total de fenoles 62
4.6 Estudios de correlación 64
4.6.1 Correlación entre los métodos de determinación de actividad antioxidante y CTF, posible incidencia sobre la capacidad antioxidante entre los métodos 64
4.6.2 Correlación entre la composición química y la actividad antioxidante de *Lippia origanoides* 68
4.7 Aplicación promisoria del AEO 72

5. Conclusiones 79

6. Recomendaciones 81

7. Productividad académica 82

8. Anexos 83

Bibliografía 91

Lista de figuras

Pág.

Figura 1-1: Algunos compuestos de los aceites esenciales del orégano..... 5
Figura 1-2: Componentes no volátiles (flavonoides) del orégano……...6
Figura 1-3: *Lippia origanoides,* Orégano de monte, (Fotos tomadas en la región del Alto Patía).(A) Región semidesértica. (B) Hojas grandes, ramas subredondeadas, estriadas y flores blancas. (C) Grandes extensiones que crece de forma silvestre en asociación con otras especies …….9
Figura 1-4: Principales componentes de un equipo de extracción por arrastre con vapor…… 12
Figura 1-5: Montaje de un equipo de extracción por hidrodestilación……..13
Figura 1-6: Diagrama de fases para una sustancia pura……... 14
Figura 1-7: Reacción de transferencia de electrones del compuesto polifenólico (A) sobre el radical DPPH. ……16
Figura 1-8: Reacción de reducción del complejo $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{+3}$ y aparición del cromóforo $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{+2}$ ……17
Figura 1-9: Mecanismo de la actividad antioxidante del β-caroteno, deslocalización de electrones en la cadena hidrocarbonada de los compuestos carotenoides ……18
Figura 1-10: Reacción del radical AAPH durante el ensayo de ORAC ……..19
Figura 1-11: Reacción del método de Folin-Ciocalteu para la cuantificación de los compuestos fenólicos…….…… 20
Figura 3-1: Ubicación de la microrregión del Alto Patía…….. 24
Figura 3-2: Cordón Panamericano del Alto Patía …….. 24
Figura 3-3: Muestra vegetal *Lippia origanoides* Kunth, (A): Muestra fresca, (B):Muestra madura seca……..25
Figura 3-4: Equipo de Arrastre con vapor del Laboratorio de Productos Naturales Vegetales. (A) Vista general:(generador de vapor de agua, alambique o extractor, cuello de cisne y condensador), (B) Dispositivo en U para recolección del aceite esencial ……..26
Figura 3-5: Equipo de Hidrodestilación del Laboratorio de Productos Naturales Vegetales (A) Tipo Clevenger, (B) Reservorio de destilación tipo *Dean-Stark*……..27
Figura 3-6: Diseño del equipo de extracción para fluidos supercríticos…… 28
Figura 3-7: Pesaje y distribución del alimento para ponedoras de la estirpe Babcock Brown…… 37
Figura 4-1: Familia de compuestos en los diferentes extractos: A) Oreganum vulgare, B) *L. origanoides* obtenido por arrastre con vapor, C) *L. origanoides*-hidrodestilación, D) EFS 40 °C-110 bar, E) EFS 50 °C-110 bar, F) EFS 60 °C -110 bar…… 43
Figura 4-2: Actividad antioxidante medida por el método antiradicalario DPPH de los extractos obtenidos de *Lippia origanoides* Kunth y los controles *Oreganum vulgare* spp *hirtum* y BHT. 48

Figura 4-3: Actividad antioxidante medida por el método del poder de reducción FRAP de los extractos obtenidos de *Lippia origanoides* Kunth y los controles *Oreganum vulgare* spp *hirtum* y BHT. 49
Figura 4-4: Actividad antioxidante medida por el método de la capacidad de absorbancia del radical oxígeno ORAC de los extractos obtenidos de *Lippia origanoides* Kunth y los controles *Oreganum vulgare* spp *hirtum* y BHT ……..... 50
Figura 4-5: Actividad antioxidante medida por el método del blanqueamiento del β-caroteno de los extractos obtenidos de *Lippia origanoides* Kunth y los controles *Oreganum vulgare* spp *hirtum* y BHT..... 52
Figura 4-6: Contenido total de fenoles de los extractos obtenidos de *Lippia origanoides* Kunth y los controles *Oreganum vulgare* spp *hirtum* y BHT 53
Figura 4-7: Familia de compuestos del extracto inicial EFS 110 bar – 60°C de *L. origanoides* (A) y de sus fracciones; Fracción 1 (B) y Fracción 2 (C). . ……57
Figura 4-8: Actividad antioxidante medida por método antiradicalario DPPH del extracto obtenido por EFS a 110 bares y 60°C de *Lippia origanoides* Kunth, sus respectivas fracciones y el estándar de timol.. 58
Figura 4-9: Actividad antioxidante medida por método del poder de reducción FRAP del extracto obtenido por EFS a 110 bares y 60°C de *Lippia origanoides* Kunth, sus respectivas fracciones y el estándar de timol…….....59
Figura 4-10: Actividad antioxidante medida por método de la capacidad de absorbancia del radical oxígeno ORAC del extracto obtenido por EFS a 110 bares y 60°C de *Lippia origanoides* Kunth, sus respectivas fracciones y el estándar de timol 60
Figura 4-11: Actividad antioxidante medida por método método del blanqueamiento del β-caroteno del extracto obtenido por EFS a 110 bares y 60°C de *Lippia origanoides* Kunth, sus respectivas fracciones y el estándar de timoll 61
Figura 4-12: Contenido total de fenoles presente en el extracto obtenido por EFS a 110 bares y 60°C de *Lippia origanoides* Kunth, sus respectivas fracciones y el estándar de timol 62
Figura 4-13: Relaciones de similaridad entre los 10 aceites esenciales estudiados anteriormente, con los aceites esenciales por arrastre con vapor e hidrodestilación de esta investigación, por medio del Análisis de Componentes Principales (ACP)..... 64
Figura 4-14: Porcentajes de la varianza acumulada obtenida para los factores extraídos del Análisis de Componentes Principales (ACP).. 69
Figura 4-15: Agrupamientos dados por el CP 1 y CP 2 del análisis de componentes principales (ACP)……..... 70
Figura 4-16: Efecto del almacenamiento sobre el contenido de malonaldehído en yemas de huevo (mg MDA/g yema de huevo)..... 74
Figura 4-17: Efecto del tipo de aceite y relación de timol sobre el contenido de malonaldehído en yema de huevo fresco (mg MDA/g yema de huevo). 75
Figura 4-18: Efecto del tipo de aceite y relación de timol sobre el contenido de malonaldehído en yema de huevo almacenado a 4°C (mg MDA/g yema de huevo). 76
Figura 4-19: Efecto del tipo de aceite y relación de timol sobre el contenido de malonaldehído en yema de huevo almacenado a - 10 °C (mg MDA/g yema de huevo).. 77

Lista de tablas

Pág.

Tabla 3-1: Clasificación taxonómica de *Lippia origanoides* Kunth 25

Tabla 3-2: Dieta comercial (Porcentaje de inclusión de ingredientes) 36

Tabla 4-1: Rendimientos de los extractos obtenidos de *Lippia origanoides* Kunth en cada método de extracción. 39

Tabla 4-2: Cantidad relativa (%) e identificación de los principales componentes (>0,01%) de aceites esenciales de *L. origanoides* Kunth del Alto Patia obtenidos por métodos tradicionales y el control *Oreganum vulgares* sp hirtum. 41

Tabla 4-3: Cantidad relativa (%) e identificación de los principales componentes (>0,01%) de aceites esenciales de *L. origanoides* Kunth del Alto Patia obtenidos por EFS a diferentes temperaturas de extracción 42

Tabla 4-4: Fraccionamiento grueso del extracto de EFS 110 bar-60°C de *Lippia origanoides* del Alto Patía. 55

Tabla 4-5: Cantidad relativa (%) e identificación de los principales componentes (>0,01%) de la Fracción 1 y Fracción 2 del aceite esencial de *L. origanoides* Kunth del Alto Patía obtenido mediante EFS 110 bar-60°C 56

Tabla 4-6: Potencialidad de los fenoles del extracto total EFS 100bar-60°C y de sus fracciones de *L. origanoides* Kunth del Alto Patía 63

Tabla 4-7: Correlación entre el contenido total de fenoles y actividad antioxidante de los extractos de *L. origanoides* Kunth del Alto Patía mediante las diferentes técnicas de extracción. 65

Tabla 4-8: Capacidad antioxidante de los extractos de L. origanoides Kunth del Alto Patia, O. vulgare, BHT y el timol 66

Tabla 4-9: Correlación entre el contenido total de fenoles y actividad antioxidante del extracto total EFS 100bar-60°C y sus fracciones de *L. origanoides* Kunth del Alto Patía..... 68

Tabla 4-10: Coeficientes de regresión, obtenidos mediante Regresión Lineal Múltiple para los compuestos de mayor variación (timol, carvacrol, acetato de timilo, ρ-cimeno, trans-β-cariofileno y α-humuleno) usando las técnicas de actividad antioxidante de los extractos de *L. origanoides* Kunth del Alto Patía 71

Tabla 4-11: Contrastes de acuerdo a un diseño completamente al azar con arreglo actorial 3x2x4 73

Lista de abreviaturas y acrónimos

%AA	Porcentaje de actividad antioxidante
Abs	Absorbancia
ACP	Análisis de componentes principales
AE	Aceite esencial
AG	Acido gálico
ANOVA	Análisis de varianza
AV	Destilación por arrastre con vapor
BHT	Butilhidroxitolueno (3,4-di-t-butil-4-hidroxitolueno)
BET	Blanqueamiento del β-caroteno
°C	Grados centígrados
CA	Capacidad antioxidante
CC	Cromatografía en columna
CCD	Cromatografía en capa delgada
CCF	Cromatografía de columna flash
CG	Cromatografía de gases
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CORPOICA	Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria
CP	Componente principal
CTF	Contenido total de fenoles
DPPH	Captura de radicales libres que utiliza el radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo.
EFS	Extracción con fluido supercrítico
Eq	Equivalentes
FID	Detector de ionización en llama

FRAP	Poder antioxidante de reducción férrica
FS	Fluido supercrítico
HD	Hidrodestilación
Hz	Hertz
I_K	Índice de Kovats
Istd	Estándar interno
IR	Infrarrojo
mg	Miligramos
mL	Mililitro
ME	Método de extracción
MV	Material vegetal
ORAC	Capacidad de absorbancia del radical oxígeno
RLM	Regresión lineal múltiple
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-visible

Introducción

los recursos naturales. La precipitación allí es escasa y en años del fenómeno del niño se han presentado eventos de extrema sequía, que han durado meses. Con el paso de los años la vegetación nativa ha cambiado, siendo hoy en día la propia de regiones semidesérticas. Por lo anterior, se considera que en esta región la naturaleza, a causa del cambio climático y la deforestación, sobrepasó los límites de autoregulación (resciliencia), hasta convertirse en un enclave subxerofítico. Desde los años cincuenta, la base de su economía ha sido el maíz; llegando a conocerse como la primera productora en zonas de ladera del país, con un rendimiento promedio de 3 ton/ha. Hoy en día, su producción, altamente vulnerable al clima, frecuentemente es nula. Esta situación y la falta de alternativas ha traído como consecuencia la implantación de cultivos ilícitos y conflictos sociales.

En Colombia, existen nichos naturales para especies de *Lippia origanoides* ubicados en zonas con ambientes secos o semidesérticos que abundan de forma silvestre como la zona del Cañon del Río Chicamocha (Santander) y en el cordón panamericano la región del Alto Patía, la primer zona ha tenido una serie de caracterizaciones mientras que la segunda aún no se ha estudiado a profundidad.

Una de las estrategias para contribuir a la generación de trabajo e ingresos alternativos, es darle valor agregado a las nuevas especies xerofíticas, adaptadas a las condiciones climáticas. Una de estas especies seleccionada, para darle valor agregado a nivel local, es el orégano de monte (*Lippia origanoides*), que no se ve muy afectado por la falta de lluvia. El orégano es el resultado de un proceso de adaptación a las condiciones agroecológicas, que ha tomado décadas y crece abundantemente de manera silvestre.

Los aceites esenciales han sido estudiados en los últimos años debido al creciente interés por sustituir los aditivos sintéticos en los alimentos, favoreciendo la estabilidad de los alimentos y protección contra las alteraciones lipídicas por su actividad antioxidante. Se ha demostrado que el orégano contiene sustancias con actividad antioxidante, antimicrobiana, antifúngica, entre otras. Por lo que no sólo es benéfico para la salud humana, por ser inhibidor de la mutagenicidad, sino que adicionalmente se ha introducido como un aditivo en la alimentación animal, con el fin de mejorar el rendimiento productivo, la salud y el aprovechamiento de los nutrientes de los alimentos (Gollnisch et al., 2001).

Los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos volátiles extraídos de diferentes partes de la planta, tales como hojas, tallos, raíces, flores, cáscaras de frutos y

su obtención se realiza principalmente por hidrodestilación o arrastre con vapor, métodos industriales, relativamente económicos y fáciles de implementar. Cada especie suele presentar una notable variación en la composición de su aceite esencial, debido a la existencia de quimiotipos, los cuales son individuos de una misma especie botánica, morfológicamente idénticos, pero diferentes en la composición química de sus metabolitos secundarios volátiles. Los componentes químicos de los aceites esenciales de orégano de mayor frecuencia son limoneno, trans-β-cariofileno, p-cimeno, linalol, α-pineno, carvacrol y timol.

La producción mundial de orégano seco supera las 60.000 toneladas/año y si a esto se le agregan los productos frescos, congelados y los que se destinan a la producción de aceites esenciales y oleorresinas, se llega a un mercado de exportación en expansión, que en el caso de Colombia es factible de incrementar exitosamente por productores nacionales, en la medida que la calidad del producto cumpla con las crecientes exigencias del mercado nacional e internacional. Se estima que en 2002, las exportaciones de orégano seco no manufacturado con destino a los Estados Unidos fueron de 6.648 toneladas, México participó con una cantidad de 2.143 toneladas, sólo por debajo de Turquía.

Existen diferentes tipos de orégano entre ellos se encuentra el género *Origanum* que pertenece a la familia Lamiaceae y el *Lippia,* a la familia Verbenaceae. El género *Lippia* es uno de los géneros de mayor explotación de sus aceites esenciales que incluye alrededor de 200 especies de hierbas, arbustos y árboles pequeños; la mayoría se encuentran distribuidos en Centro y Sudamérica, y en la zona tropical africana.

Según el panorama anterior, el presente trabajo se enmarca en la valoración y aprovechamiento sostenible de especies promisorias, con un alto potencial de producción de biomoléculas, que permitan el desarrollo agroindustrial mediante la articulación de su producción con la transformación industrial y la comercialización, en escenarios de mercado con un alto valor agregado.

Por lo cual este estudio fue dividido en cinco etapas, a saber: (i) la comparación de tres métodos de extracción de los AEO (arrastre con vapor, hidrodestilación y extracción por fluidos supercríticos), para establecer el de mayor rendimiento, (ii) el análisis composicional de los extractos obtenidos, (iii) la evaluación de la actividad antioxidante de los mismos, (iv) la correlación entre cada una de las variables (métodos de extracción, composición y actividad antioxidante) con el fin de determinar que compuestos tanto mayoritarios como aquellos minoritarios están asociados a la actividad antioxidante del AE y (v) el estudio preliminar sobre una posible aplicación del AEO obtenido.

1. Estado actual del tema

1.1. El Orégano

El orégano es el nombre común para el aroma y sabor en general derivado principalmente de más de 60 especies de plantas utilizadas en todo el mundo como condimento o especia; se conocen dos grandes grupos de orégano: el orégano mediterráneo o europeo y el mexicano. El primero proviene de diversas especies del género *Origanum vulgare* subs*. hirtum* (orégano griego) y *O. vulgare* subs*. gracite* (orégano turco). El orégano mexicano proviene de dos especies de la Familia Verbenaceae: *Lippia palmeri* y principalmente de *Lippia graveolens*. El orégano del género *Origanum* (europeo), se extrae generalmente de plantaciones comerciales bien establecidas, mientras que el mexicano se obtiene de poblaciones silvestres de casi todo el territorio sin ningún plan de manejo. En Colombia se encuentra en forma silvestre el llamado orégano de monte *Lippia origanoides*, el cual es de origen Neotropical y todas sus características indican que es conespecífica con *Lippia suaveolens*, que crece desde el sur de EU hasta Guatemala (Kintzios, 2002).

La mayoría de las especies de orégano poseen notables propiedades medicinales, que se explican por la extraordinaria y compleja composición química que tienen estas plantas. En la práctica terapéutica (herbolaria) las especies de orégano europeas (*Origanum* spp) y las mexicanas (*Lippia* spp) se administran para las mismas dolencias. Las hojas y los tallos del orégano contiene aceite esencial, sustancias tónicas, un principio amargo, goma-resina, entre otras; la esencia tiene como componentes principal, el carvacrol y también contiene timol, α-pineno, ρ-cimeno, terpenos principalmente. Glucósidos iridoides, fenilpropanoides, naftoquinonas y flavonoides son los cuatro tipos de metabolitos secundarios no volátiles reportados en *Lippia*, los cuales le dan propiedades tónicas: amargo-excitante, antisépticas, expectorantes, diuréticas y sudoríficas (Kintzios, 2002). También se le considera un producto duradero de consumo final, ya que una vez deshidratado conserva sus propiedades y no sufre descomposición, en México se usa para condimentar alimentos y como medicina popular, en forma de infusiones, para tos, cólicos, padecimientos de los riñones, fiebre y enfermedades de las vías respiratorias (http://biblioteca.coqcyt.gob.mx/bvic/Captura/upload/ACTIVIDAD-ANTIMICROBIANA-TESIS.pdf. 2010). En el caso de *L. origanoides*, las hojas son utilizadas en infusión para el tratamiento de la diarrea, como analgésico, antiinflamatorio y antipirético. Otros autores

han reportado propiedades como antioxidantes, antisépticas, calmantes, cicatrizantes, desinflamante, digestiva, estomáquica y estimulante (http://sisav.valledelcauca.gov.co. 2010).

1.1.1. Composición química de los aceites esenciales del orégano

La composición y la cantidad de los metabolitos secundarios del orégano dependen de factores climáticos, la altitud, la época de cosecha, y su estado de crecimiento. Por lo anterior el estudio de dichos factores y su influencia en su cultivo es importante para su mejor aprovechamiento y explotación (Arcila et al., 2004).

Los monoterpenoides, son los responsables de las fragancias y las sensaciones de olor-sabor de muchas plantas. Estructural y biológicamente son muy diferentes, llegándose a clasificárseles hasta en 35 grupos. Por otro lado, el timol y el carvacrol son compuestos fenólicos naturales, considerados como posibles antioxidantes, agentes antifúngicos y antibacteriales, acaricidas, analgésicas, antiacné, antiespasmódicas, deodorantes, dermatigénicas, expectorantes, insecticidas, larvicidas, pesticidas y vermicida presentes en cantidades significativas en los aceites esenciales del género *Thymus,Origanum, Satureja, Thymbra y Lippia* (Duke, 2002).

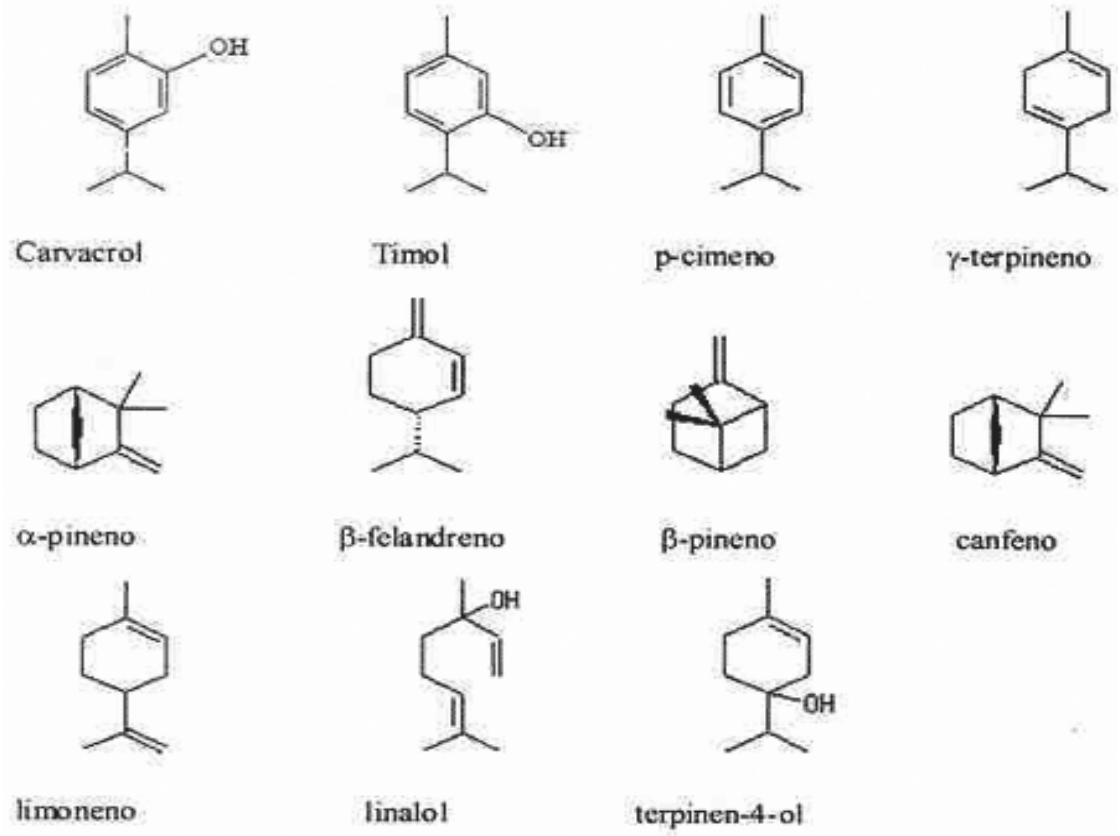
Los principales quimiotipos de la especie *O. vulgare* están compuestos por el carvacrol y el timol cada una con enzimas específicas que dirigen su biosíntesis. Así por ejemplo, se encontró que los compuestos químicos presentes en mayor concentración en el aceite esencial del orégano mexicano (*Lippia berlanderi Schauer*) son el timol y el carvacrol. Otras especies como el *Orégano vulgare* subsp. *hirtum* (comercialmente conocidas como orégano griego) tienen también altos contenidos de estos fenoles (carvacrol + timol 78,27%) en los aceites esenciales obtenidos de la planta. Otros componentes presentes son monoterpenos hidrocarbonados, γ-terpineno y p-cimeno (5,54 y 7,35% del total del aceite, respectivamente) (Poulose y Croteau, 1978).

La subespecie *O. vulgare* sp*. hirtum* es la más estudiada, especialmente en relación a la composición y calidad de su aceite esencial, ya que este último tiene un importante valor comercial. En esta subespecie el rendimiento del aceite esencial en la hoja seca varía entre 2% y 6%, porcentaje que se ve afectado por la altitud del lugar de cultivo y por la época de recolección, siendo éste más bajo en el otoño (Russo et al., 1998; Milos et al., 2000). Los compuestos mayoritarios encontrados en *O. vulgare* sp*. hirtum* son el carvacrol, timol, p-cimeno y γ-terpineno, aunque en diversos estudios realizados por cromatografía de gases/espectrometría de masas se han identificado de 16 a 56 compuestos diferentes. Estos componentes también se han encontrado en *O. dictamnus* y se sabe que otras especies como *O. scabrum* y *O. microphyllum* contienen alrededor

de 28 y 41 compuestos diferentes, respectivamente. En el aceite del orégano que crece en forma silvestre se ha encontrado la presencia dominante de carvacrol y timol. Se ha observado que un incremento en los porcentajes de timol provoca una disminución en el contenido de carvacrol. De igual manera, los hidrocarburos monoterpenoides γ-terpineno y p-cimeno están presentes de manera constante en los aceites esenciales, pero siempre en cantidades menores a las de los dos fenoles.

En el aceite del orégano silvestre cultivado en hidroponia 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). Los aceites esenciales de especies de *Lippia* contienen limoneno, β-cariofileno, p-cimeno, canfor, linalol, α-pineno y timol, los cuáles pueden variar de acuerdo al quimiotipo ver figura 1-1 (Arcila et al., 2004).

Figura 1-1: Algunos compuestos de los aceites esenciales del orégano

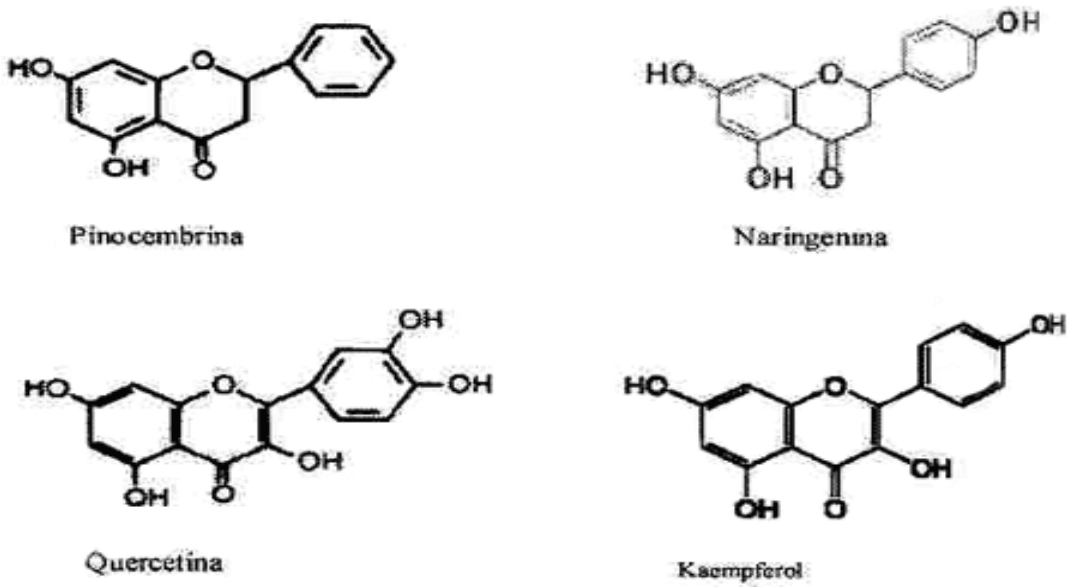


Una característica sobresaliente del genero *Lippia* es la diferencia observada en la composición del aceite esencial reportado para la misma especie de diferentes orígenes geográficos. Sin embargo, vale la pena señalar que los aceites obtenidos a partir de la

misma especie cultivada en una eco-región específica se mantiene constante durante el tiempo (Soler et al., 1986; Souto et al., 1996 y 1997). Por ejemplo, el género *Lippia dulcis* posee una rica diversidad genética de biosintetizar mono y sesquiterpenoides. 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, de los cuales las flavonas son el tipo predominante de flavonoides. 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 *Lippia* ha sido en gran parte dedicada al estudio de aceites esenciales. Sin embargo, se puede anticipar que las investigaciones sobre iridoides, que son marcadores quimiotaxonómicos de las Verbenaceae, y naphthoquinoides así como de otros metabolitos secundarios no volátiles, serán necesarios para comprender este género muy complejo (Kintzios, 2002). En extractos metanólicos de hojas de *L. graveolens* se han encontrado iridoides (loganina, secologanina, secoxiloganina, dimetilsecologanosido, ácido logánico, ácido 8-epi-logánico, carioptosido), flavonoides (naringenina, pinocembrina, lapachenol e icterogenina), entre otros. En la figura 1-2 se presentan las estructuras químicas de algunos de los compuestos principales presentes en el orégano (Martínez, 2003; Arcila et al., 2004).

Figura 1-2: Componentes no volátiles (flavonoides) del orégano



1.1.2. Actividad biológica de los componentes del orégano

Dentro de las actividades biológicas del orégano (género *Origanum* y *Lippia*) se encuentran la actividad antimicrobiana, antiparasítica, estrogénica, antigenotóxica, insecticida y antioxidante. La principal es su capacidad antioxidante, especialmente en especies del género *Origanum*. La función antioxidante de diversos compuestos en los alimentos ha atraído mucha atención en relación con el papel que tienen en la dieta en la prevención de enfermedades (Kahkonen et al., 1999). En algunos estudios de especias se han aislado una amplia variedad de compuestos antioxidantes fenólicos. El efecto antioxidante de las plantas se debe a la presencia de grupos hidroxilo en los compuestos fenólicos (Azuma et al., 1999).

El potencial antioxidante de los extractos de orégano ha sido determinado por su capacidad para inhibir la peroxidación lipídica, protegiendo al ADN del daño por radicales hidroxilo, con los métodos de atrapamiento de peróxido de hidrógeno, atrapamiento de HOCl y por la prueba de la rancidez (Dragland et al., 2003). La actividad antioxidante depende del tipo y polaridad del solvente extractante; por ejemplo, los antioxidantes obtenidos con agentes lipofílicos son más efectivos en emulsiones. El aceite esencial de *O. vulgare* tiene actividad anti-radical y esta propiedad se le atribuye a los fenoles carvacrol y timol (Deighton et al., 1993). Varios investigadores confirman el potencial antioxidante de extractos y aceites esenciales de diferentes variedades de orégano (*O. vulgare*, *O. compactum*, *O. majorana*) (Baratta et al., 1998 a,b). Lecona et al. evaluó el potencial antioxidante del aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth) obtenido de hojas secadas a la sombra y al sol, los resultados muestran que la mejor actividad antioxidante con el método del β-caroteno, se obtuvo en el aceite que proviene de las hojas de orégano secadas a la sombra (2003).

Las propiedades antioxidantes de los aceites esenciales (AE) basados en estudios animales han sido investigados por Youdim y Deans, donde ratas alimentadas con aceite de tomillo y timol mantienen altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados en las fracciones fosfolipídicas 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 (1999a,1999b, 2000). Hay también evidencia en gallinas ponedoras, que hay disminución en la oxidación lipídica de yema de huevo almacenada en refrigeración por la adición de timol en la dieta, medido por la formación de malondialdehído, prolongando el tiempo de almacenamiento y reduciendo o eliminando la necesidad de una estabilidad oxidativa adicional (Botsoglou et al., 1997). El timol y cimeno-2,3-diol, son los responsables de la actividad antioxidante del tomillo, han sido medidos en huevos colectados durante un período de alimentación de 24 días; aproximadamente, fue transferido 0,004% de cimeno-2,3-diol y 0,006% de timol a la yema del huevo después de 12 días de alimentación, y los compuestos desaparecieron tan pronto se paró la suplementación (Krause y Ternes, 1999). La suplementación dietaria con hierbas y extractos de hierbas es una estrategia simple y muy conveniente para introducir

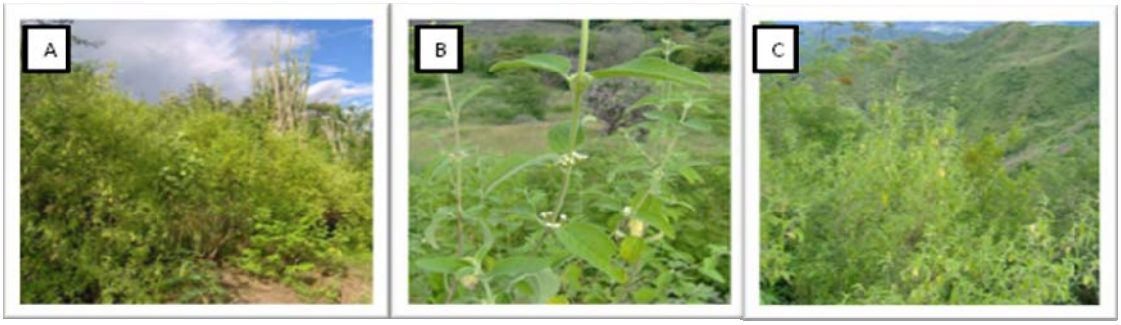
antioxidantes naturales en la comida de aves. Los resultados presentados en éstos estudios muestran un aumento en la capacidad antioxidante de los tejidos de pavo como resultado de una suplementación dietaria de aceite de orégano y /o acetato de α-tocoferol. La inclusión de aceite de orégano 200 mg/kg dieta fue más efectiva en inhibir la oxidación lipídica comparada con la inclusión de 100 mg/kg, pero equivalente a la inclusión de 200 mg/kg de acetato de α-tocoferol (Botsoglou et al., 2002a,b; Botsoglou et al., 2003a,b,c; Papageorgiou et al., 2003). Por otro lado, Marcincak et al. mostraron que la adición de aceite esencial de orégano en dietas de pollos fue más efectivo en el retardo de la oxidación comparada con la dieta control (2008).

1.2. Características generales del *Lippia origanoides*

En Colombia suele encontrarse *L. origanoides* en los departamentos de Guajira, Magdalena, Cauca (Alto Patía), Cundinamarca, Norte de Santander y Santander. En este último se encuentra a altitudes entre 500-800 m.s.n.m formando asociaciones vegetales con otras especies características de la región (Ruiz et al., 2007). Las especies de *L. origanoides* son pequeños arbustos con hojas más grandes que las especies de *Origanum* y vienen principalmente de México, son plantas silvestres. El aceite de orégano mexicano contiene aproximadamente la misma cantidad de carvacrol y timol y pequeñas cantidades de 1,8-cineol y otros compuestos. La composición básica del aceite varía con la fuente de la planta y el área geográfica del crecimiento. Las especies de orégano del género *Lippia* son generalmente reconocidas seguras para consumo humano como aromatizantes naturales y condimento. *Lippia origanoides* es un arbusto aromático, con olor a orégano en la mayoría de quimiotipos, ocasionalmente cítrico o excepcionalmente inodoro de hasta 3,5 m de alto, muy ramificado; ramas sub redondeadas, estriadas, hirto pubescentes, hojas opuesto decusadas, pecíolos cortos, 1-10 mm largo, limbos verdes a verde oscuro por la haz gris plateado por el envés, tamaño de la hoja muy variable según los ambientes sean propicios (6 x 3,5 cm) o más secos y/o pobres (5 x 3 mm), lanceolado o ovado oblongo, crenado denticulado a lo largo del margen; presenta inflorescencia axilares verticiladas, 4-6 por axila, pedúnculos 1-6 mm, generalmente más cortas que las hojas que la subtienden, cabezuelas ovado tetrágonas a prismático alargadas, 4-15 mm de largo, brácteas florales ovadas, en 4 series, imbricadas más cortas que las flores; flores en 4 series, imbricadas 4mm de largo, fragantes de pétalos unidos, blancas, cáliz comprimido, aovado, bífido, fruto oblicuamente ovado, subcomprimido, cubierto por el cáliz persistente. Los frutos son pequeñas núculas que contienen las semillas de color café, no mayores de 0,25 mm. La característica no caduca de las brácteas de la inflorescencia, indica una transición hacia la dispersión por viento de la cabezuela completa más que las núculas sueltas. Esta especie crece bien reproducida por estaca, tiene buena adaptación al estrés y no son susceptibles a chinches de encaje, que suelen atacar fuertemente a *Lippia alba* de origen mexicano. La ausencia de estaciones, podía dar ventaja a Colombia frente a la

producción de México (http://sisav.valledelcauca.gov.co. 2010). En la figura 1-3 se observan las características en cuanto al tipo de suelo; sus hojas, flores y la gran extensión donde crece la *Lippia origanoides.*

Figura 1-3: *Lippia origanoides,* orégano de monte, (Fotos tomadas en la región del Alto Patía). (A) Región semidesértica. (B) Hojas grandes, ramas subredondeadas, estriadas y flores blancas. (C) Grandes extensiones que crece de forma silvestre en asociación con otras especies



La zona que está ampliamente caracterizada es la del Santander, en donde se han realizado diferentes estudios, entre ellos la caracterización genotípica y el establecimiento de una huella genómica del genero *Lippia* nativa del Cañón del Chicamocha (Santander, Colombia), Suárez et al. llevaron a cabo un estudio piloto en busca de polimorfismos intra e interespecíficas en cuatro regiones del ADN del cloroplasto de *Lippia origanoides*, *Lippia alba*, *Lippia citriodora* y *Lippia dulcis* (2007). Posteriormente estos autores describieron la estructura genética de una población natural de la *Lippia origanoides* utilizando la estadística de auto correlación espacial de los marcadores inter-microsatélite (ISSR). Los resultados sugirieron que el muestreo de los individuos a una distancia más grande de ~ 1,2 km puede dar lugar a la obtención de genotipos diferentes, lo que podría ayudar a preservar los niveles de diversidad genética en un programa de propagación.

(http://cenivam.uis.edu.co/cenivam/general/documentos/Art%C3%ADculos%20Lippia%20alba%20%20Lippia%20origanoides%20CIBIMOL_2003_2.pdf. 2010).

Por otro lado, Stashenko et al. realizaron una diferenciación de quimiotipos basados en el análisis cromatográfico de aceites esenciales de *Lippia origanoides* procedentes de Santander (2010). Vicuña et al. evaluaron la composición química de los aceites esenciales (EO) obtenidos a partir de *Lippia origanoides* colectada del Cañon del río Chicamicha en Santander mediante hidrodestilación asistida por radiación de microondas y su efecto protector del ADN contra bleomicina induciendo genotoxicidad, proporcionando evidencia sobre el potencial quimiopreventivo de dicho aceite (2010).

Ruiz et al. analizaron extractos de hojas de dos quimiotipos de *Lippia origanoides*, cultivados en el Complejo Agroindustrial de CENIVAM (UIS). Se utilizaron las técnicas de extracción: hidrodestilación asistida por radiación de micro-ondas, extracción con solvente - destilación simultánea y extracción con fluido supercrítico. Los metabolitos secundarios fueron separados por cromatografía de gases y detección de masas. La identificación se llevó a cabo por comparación de espectros de masas con bases de datos, patrones e índices de Kovats. Los compuestos mayoritarios en los extractos para el quimiotipo I fueron p-cimeno (13%) y 1,8-cineol (9%) y para el quimiotipo II timol (56%) y p-cimeno (10%) (2007).

Castañeda et al. estudiaron los aceites esenciales de las hojas de 10 plantas aromáticas colombianas colectadas en los Departamentos de Santander, Meta, Bolívar, Sucre y Cesar, entre ellas *Lippia origanoides*, encontrando dos quimiotipos para el aceite esencial de esta especie mediante hidrodestilación asistida por radiación de microondas: el quimiotipo A (típico) cuyos componentes mayoritarios fueron carvacrol (36,6%), p-cimeno (14,0%), terpineno (13,3%), timol (9,1%), y α-terpineno (3,8%); mientras que, para el quimiotipo B (atípico) los componentes mayoritarios fueron p-cimeno (15,7%), trans-β-cariofileno (9,4%), α-felandreno + d-3-careno (8,7%), limoneno (6,9%) y β-felandreno + eucalipto (2007).

Torres et al. determinaron la composición química del aceite esencial de dos quimiotipos de la especie *Lippia origanoides* cultivada en un corregimiento de Palmira, Colombia. Los aceites esenciales fueron obtenidos mediante destilación por arrastre con vapor en un equipo tipo Clevenger modificado y analizados por cromatografía de gases (CG) acoplada a espectrometría de masas (EM). La identificación de las sustancias se realizó con base en los índices de Kovats y por comparación de sus espectros de masas con las sustancias de referencia. El aceite esencial de uno de los quimiotipos presentó una constitución principalmente monoterpénica, siendo el timol (45%) el componente mayoritario mientras que el aceite esencial del otro quimiotipo presentó una constitución sesquiterpénica siendo el trans-β-cariofileno (17%) el componente principal (2007).

Blanco et al. caracterizaron la composición y el rendimiento del aceite esencial (AE) de arbustos de *Lippia origanoides*, durante la época de lluvia y la época de sequia, en el ambiente semiárido del Cañón del Chicamocha (Santander, Colombia). El aceite esencial de *L. origanoides*, fue obtenido del follaje de los arbustos mediante hidrodestilación asistida por microondas y la determinación de la composición del AE a través de análisis de cromatografía de gases acoplada a un espectrometría de masas (CG/EM). Los compuestos carvacrol, timol, p-cimeno, terpineno, mirceno, terpineno, trans-cariofileno, acetato de carvacrilo y acetato de timilo fueron identificados como los componentes mayoritarios en el AE de esta especie, independientemente de la época de colecta (2006).

Es necesario resaltar que Stashenko et al. realizaron un estudio de AEO de una región Nariñense; sin embargo en dicho estudio se empleó un equipo de EFS en el que se

introduce un Soxhlet (metodología no exhaustiva). En dicho estudio no se reportó ni la composición, ni el rendimiento obtenido por EFS (2010).

Respecto a los estudios mencionados anteriormente se observa la importancia del método de extracción, a continuación se hará referencia a dicho tema.

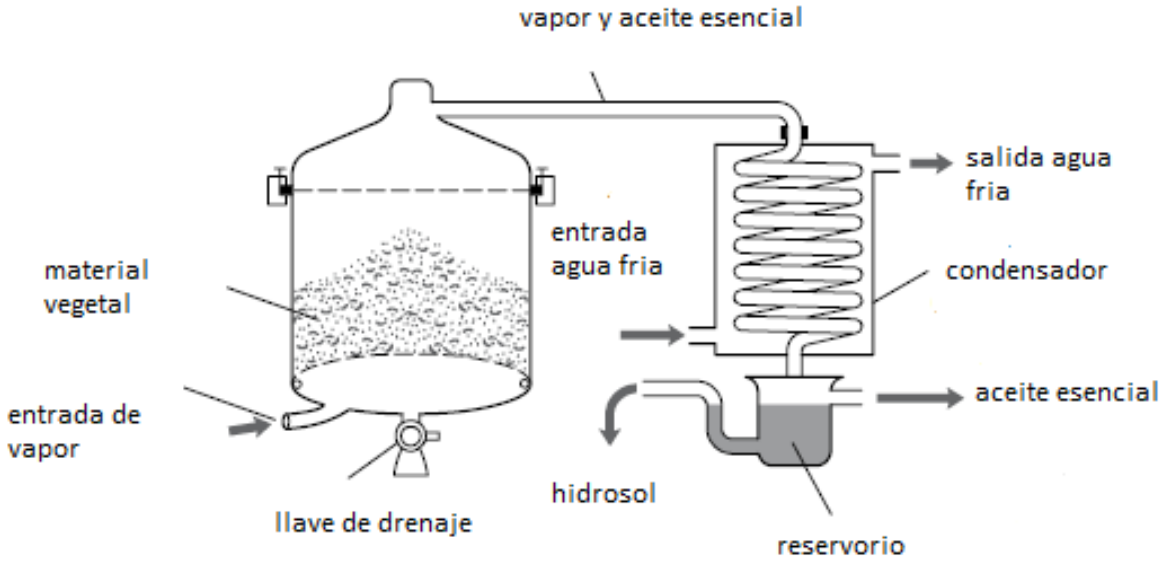
1.3. Extracción de aceites esenciales

La extracción de los aceites esenciales del material vegetal puede ser llevada a cabo por una variedad de procesos antiguos y nuevos, como la destilación con vapor, hidrodifusión, enfluerage, maceración, la extrusión mecánica (frío), extracción con disolventes y extracción con fluido supercrítico (EFS). Los aceites esenciales crudos producidos por cualquiera de estos métodos pueden ser necesarios para ser refinados o adicionalmente procesados, ya sea por una combinación adecuada de los procesos anteriores o por redestilación, fraccionamiento, cromatografía, cristalización, tratamiento químico, etc., dependiendo de la naturaleza de la materia prima y la calidad deseada del producto y las especificaciones (Sarker et al., 2006).

1.3.1. Destilación por arrastre con vapor

Los aceites esenciales son predominantemente obtenidos por destilación con vapor, usando vapor directo o indirecto. El vapor se genera en una caldera individual y se inyecta en la parte inferior del recipiente con el material vegetal (Figura 1-4, Clarke, 2008). La extracción del aceite esencial se ve facilitada por la destilación de dos líquidos inmiscibles, es decir, agua y aceite esencial. Luego el vapor de agua y vapores de aceites esenciales se condensan y se separan; el aceite generalmente es más ligero que el agua, flota en la parte superior y el agua va al fondo. Algunos aceites muy volátiles pueden perderse en el proceso de destilación, además, se pueden inducir cambios químicos, tales como la oxidación o la hidrólisis. Por lo tanto, los aceites esenciales recuperados por destilación por vapor son a menudo diferentes de los presentes en la fuente original (Lee et al., 2009; Sánchez, 2006).

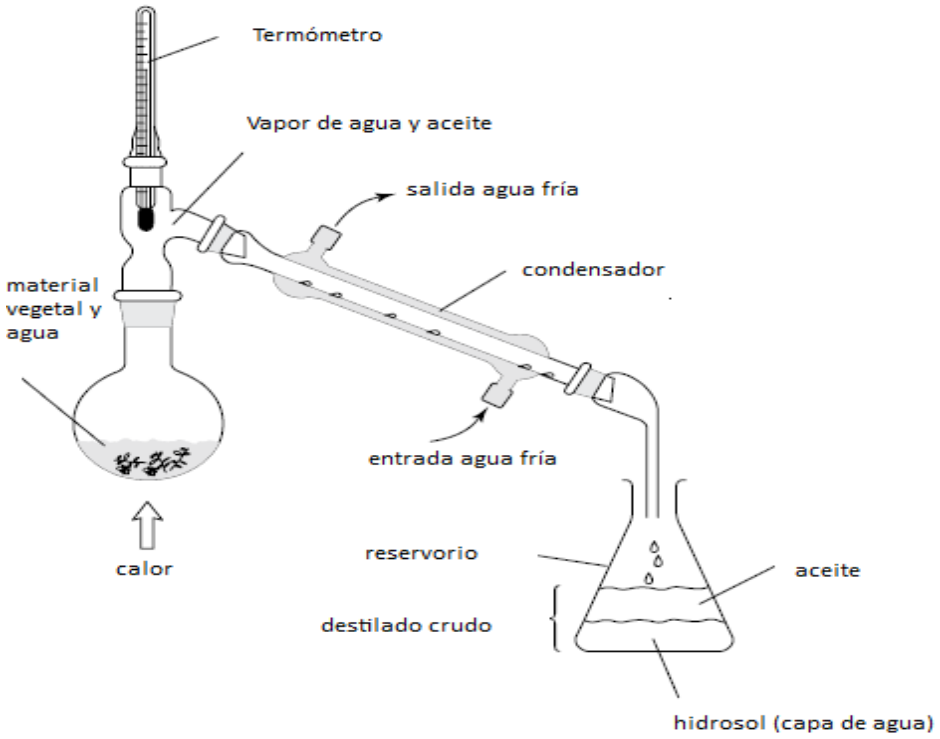
Figura 1-4: Principales componentes de un equipo de extracción por arrastre con vapor.



1.3.2. Extracción por hidrodestilación

Este método consiste en llevar a estado de ebullición el agua, que penetra los tejidos de la planta y disuelve una parte del aceite esencial presente en las estructuras contenedoras; esta solución acuosa se difunde a través de las membranas de las células y el aceite se vaporiza inmediatamente desde la superficie. Este proceso continua hasta que se remueve todo el aceite contenido en las glándulas de la planta. 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. Luego, a medida que avanza la destilación, los compuestos se liberan en función de su temperatura de ebullición, siendo la última fracción muy rica en sesquiterpenos y sus análogos oxigenados (Figura 1-5, Clarke, 2008). Otro factor que juega un papel importante durante la extracción mediante esta técnica, es el contenido de compuestos grasos (lípidos) en la planta, ya que son poco volátiles y en cierto modo, retienen la fracción de hidrocarburos volátiles, los cuales muestran más afinidad por los compuestos grasos que por los compuestos oxigenados (Sánchez, 2006; Sarker et al. 2006).

Figura 1-5: Montaje de un equipo de extracción por hidrodestilación



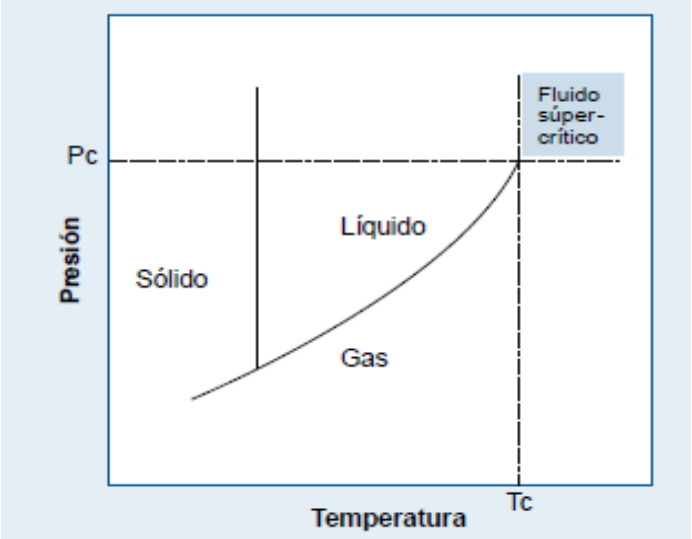
1.3.3. Extracción con Fluidos Supercríticos

Los fluidos supercríticos (fluidos supercríticos) están reemplazando cada vez más los disolventes orgánicos, por ejemplo, n-hexano, diclorometano, cloroformo, que se utilizan convencionalmente en la extracción industrial, purificación y operaciones de recristalización debido a las regulaciones actuales. En la extracción y el aislamiento de productos naturales, la extracción con fluido supercrítico (EFS), sobre todo el empleo de CO_2 supercrítico, se ha convertido en el método de elección. Tecnologías modernas permiten una regulación precisa de los cambios de temperatura y presión, y por lo tanto la manipulación de la capacidad de solubilizar del fluido supercrítico (FS), que ayuda a la extracción de productos naturales en una amplia gama de polaridades (Doane y Liescheski, 2004).

Cagniard de la Tour descubrió el punto crítico en 1822, citado por Williams y Clifford (2000), el cual indica el valor máximo de temperatura y presión en la que una sustancia pura puede existir en equilibrio líquido-vapor. A temperaturas y presiones por encima de

este punto, una sustancia se denomina fluido supercrítico (FS); es pesado como un líquido, pero tiene el poder de penetración de un gas; dichas cualidades lo hace un solvente efectivo y selectivo. Los FS son producidos por el calentamiento de un gas por encima de su temperatura crítica o la compresión de un líquido por encima de su presión crítica, tal como se observa en la Figura 1-6 (Esquivel y Vargas, 2007). En estas condiciones, el volumen molar es el mismo, con independencia de si la forma original es un líquido o un gas, el FS puede ser utilizado para extraer ingredientes activos o analitos de diversas plantas y muestras de microbios, y puede ser particularmente útil en la extracción de productos naturales desconocidos o la preparación de extractos de organismos completos para ensayos químicos y biológicos en cualquier programa de screening. El fluido supercrítico más comúnmente utilizado es el CO_2, sin embargo se utilizan por ejemplo, etano, butano, pentano, amoníaco, trifluorometano y el agua. Las principales ventajas de la utilización de fluidos supercríticos para extracciones son que ellos son de bajo costo, libre de contaminantes. La degradación oxidativa y térmica de los compuestos activos es mucho menos probable que en la extracción de solventes convencionales y los métodos de destilación con vapor. Uno de los mejores ejemplos de la utilización de EFS en la extracción de productos naturales es el uso de CO_2 para extraer cafeína de café. Los fluidos supercríticos pueden tener poder de solubilidad similar a los solventes orgánicos, pero con mayor difusividad, baja viscosidad y baja tensión superficial (Doane y Liescheski., 2004; Sarker et al. 2006).

Figura 1-6: Diagrama de fases para una sustancia pura



Dado que un componente importante de la presente investigación se basa en determinar la actividad antioxidante del AE de *Lippia origanoides*, a continuación se realizará una corta descripción de cada uno de los ensayos realizados para tal propósito.

1.4. Evaluación de la actividad antioxidante de los aceites esenciales y contenido total de fenoles

Un gran número de métodos han sido desarrollados para evaluar la capacidad antioxidante total de alimentos, suplementos dietarios, extractos vegetales o compuestos puros. Sin embargo, pocos de ellos han sido ampliamente utilizados debido a limitaciones relacionadas con cuestiones metodológicas y fuentes de radicales libres (Prior et al., 2005; Schauss et al., 2006). Ensayos basados en el uso de radicales como $DPPH^{\cdot}$ y $ABTS^{\cdot+}$ son los métodos espectrofotométricos más populares para la determinación de la capacidad antioxidante de alimentos, bebidas y extractos vegetales (Bendini et al., 2006), los cuales han sido usados ya que son procedimientos simples, rápidos, sensibles y reproducibles (Ozcelik et al., 2003).

Los antioxidantes pueden desactivar 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 cinética y potencial de las reacciones difieren (Prior et al., 2005; Antolovich et al., 2002; Moon y Shibamoto, 2009).

1.4.1. Métodos basados por Transferencia electrónica única

Estos métodos detectan la habilidad de un potencial antioxidante (AH) de transferir un electrón, reduciendo cualquier compuesto incluyendo metales, carbonilos y radicales (Prior et al., 2005).

$$X^{\cdot} + AH \rightarrow X^{-} + AH^{\cdot+}$$

$$AH^{\cdot+} \xrightarrow{H_2O} A^{\cdot} + H_3O^{+}$$

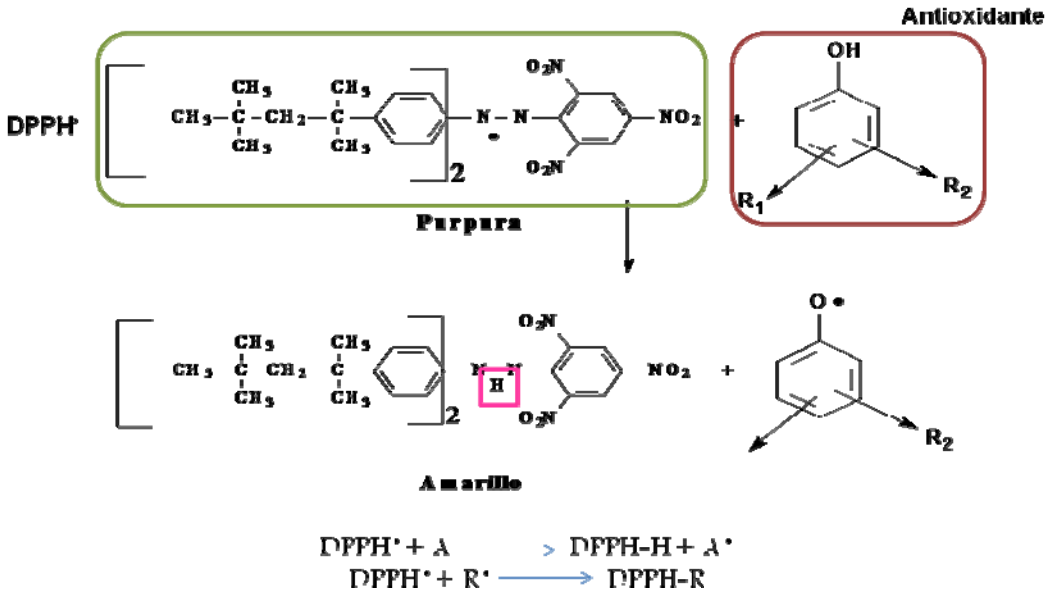
$$X^{-} + H_3O^{+} \rightarrow XH + H_2O$$

$$M(III) + AH \rightarrow AH^{+} + M(II)$$

1.4.1.1. DPPH (Ensayo actividad antiradicalaria)

Es un ensayo simple y altamente sensible, el radical DPPH es un radical de nitrógeno orgánico y comercialmente disponible (Brand et al., 1995). El efecto antioxidante es proporcional a la desaparición del radical DPPH en las muestras en prueba. El monitoreo del radical DPPH con un espectrómetro UV se ha convertido en un método ampliamente y comúnmente usado que muestra un máximo de absorción a 515 nm (púrpura). Su color se torna de púrpura a amarillo por la formación de DPPH sobre la absorción de hidrógeno del antioxidante (Figura 1-7). Esta reacción es estequiométrica con respecto al número de átomos de hidrógeno absorbidos. La actividad antioxidante de una muestra es expresada en términos de µmoles de equivalentes de Trolox por 100 g de muestra (TE/100 g). Los resultados también han sido reportados como EC50, lo cual es la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración inicial del radical DPPH al 50% (Moon y Shibamoto, 2009). El efecto antioxidante también ha sido evaluado usando resonancia paramagnética electrónica (RPE); con esta técnica se realiza un "conteo" de los radicales presentes en una mezcla de DPPH y una muestra cualquiera a estudiar. La disminución con el tiempo de los radicales DPPH es una medida del efecto antioxidante de las muestras en estudio. Los resultados son dados en "equivalentes de Trolox" (Huang et al., 2005).

Figura 1-7: Reacción de transferencia de electrones del compuesto polifenólico (A) sobre el radical DPPH.

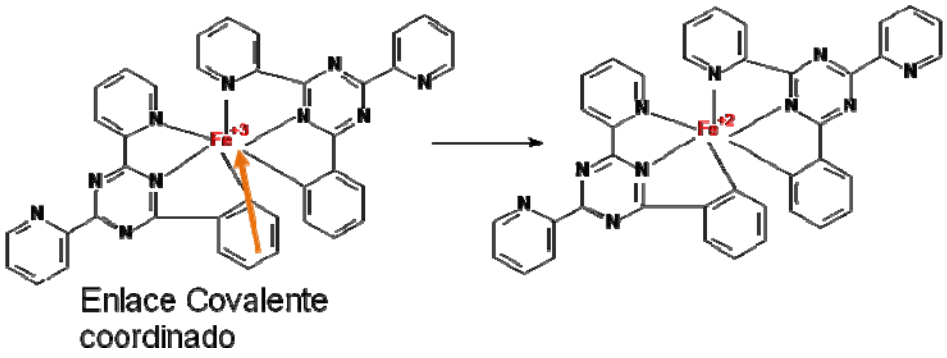


1.4.1.2. FRAP (Poder antioxidante / Reducción de hierro)

Este método fue primero desarrollado para cuantificar ácido ascórbico en suero o plasma (Benzie y Strain, 1996). Cuando el complejo Fe^{3+} - TPTZ (2, 4, 6-tripiridil-s- triazina) es reducido a la forma Fe^{2+} por un antioxidante bajo condiciones ácidas, se forma un color azul intenso con un máximo de absorción desarrollado a 593 nm (Ou et al., 2002). Por lo tanto, el efecto antioxidante (capacidad de reducir) puede ser evaluado monitoreando la formación de un complejo Fe^{2+} - TPTZ con un espectrofotómetro (Figura 1-8). Los antioxidantes de referencia pueden ser solubles en agua tales como ácido ascórbico, ácido úrico o Trolox (Moon y Shibamoto, 2009).

Figura 1-8: Reacción de reducción del complejo $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{+3}$ y aparición del cromóforo $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{+2}$ cuantificable a 593 nm.

$$[Fe(III)(TPTZ)_2]^{+3} + AH_2 \rightarrow [Fe(II)(TPTZ)_2]^{+2} + A + 2H^+ + 1e^-$$



1.4.2. Métodos basados en Transferencia de Átomos de Hidrógeno

Mediante estos métodos se mide la habilidad clásica de un antioxidante (AH) de extinguir radicales libres por donación de hidrógenos.

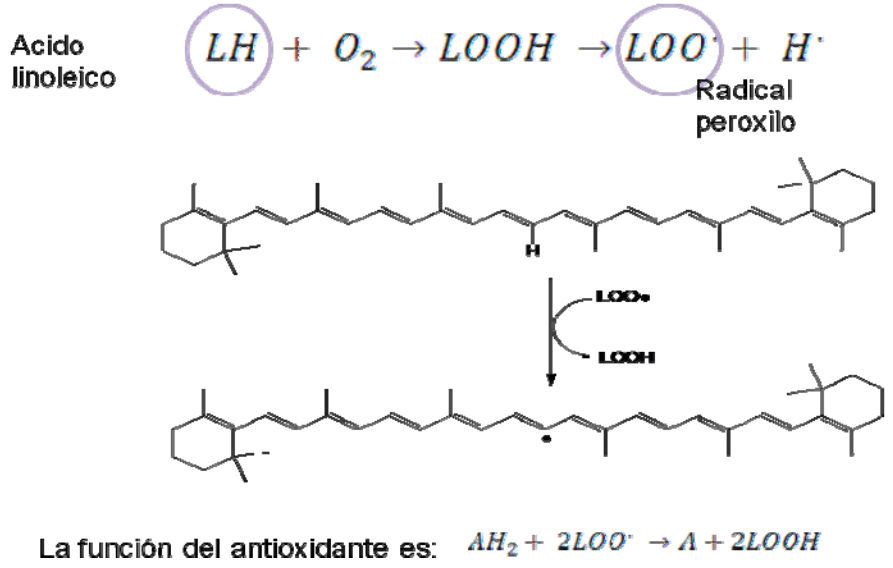
$$X^{\cdot} + AH \rightarrow XH + A^{\cdot}$$

Un número de ensayos han sido desarrollados, entre los cuales se encuentra la capacidad de absorbancia del radical oxígeno (ORAC) y el ensayo del blanqueamiento del β-caroteno (Prior et al., 2005).

1.4.2.1. Ensayo blanqueamiento β-caroteno

El método de blanqueamiento del β-caroteno (BET) está basado en la pérdida de color amarillo del β-caroteno debido a su reacción con radicales los cuales son formados por la oxidación del ácido linoleico en una emulsión (Figura 1-9). La proporción del blanqueamiento del β-caroteno puede bajar lentamente en presencia de antioxidantes (Sacchetti et al., 2005; Moon y Shibamoto, 2009).

Figura 1-9: Mecanismo de la actividad antioxidante del β-caroteno, deslocalización de electrones en la cadena hidrocarbonada de los compuestos carotenoides.



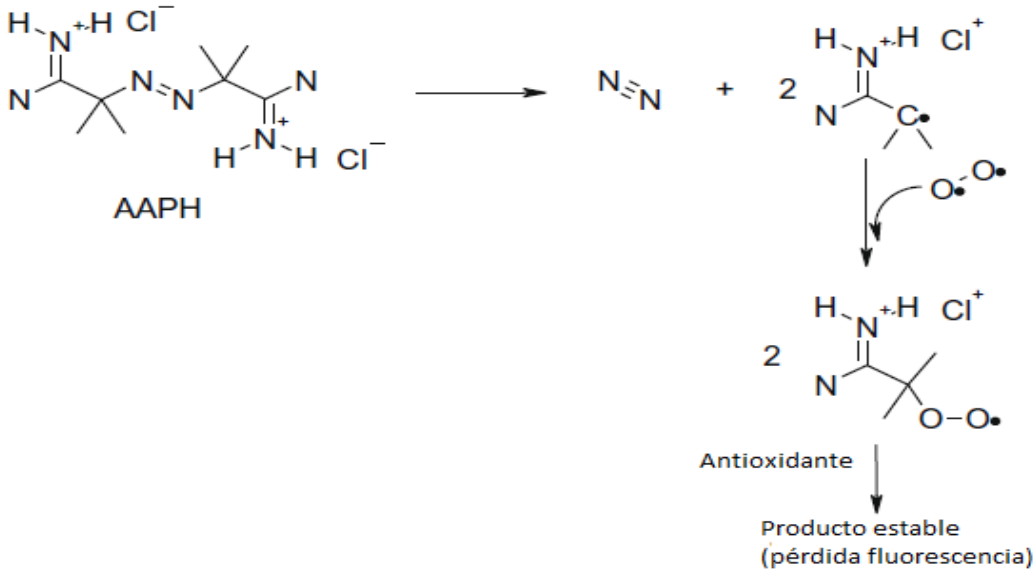
1.4.2.2. ORAC (Capacidad de absorbancia del radical oxígeno)

Con este método se mide la inhibición del antioxidante causada por el radical peroxilo que induce oxidaciones, por lo tanto a medida que la molécula fluorescente (fluoresceína) es atacada y dañada por los radicales va perdiendo su fluorescencia. La labor de los antioxidantes es la de proteger la molécula, y cuanto más capacidad antioxidante tiene un compuesto o alimento más se preserva la capacidad de emitir luz de la molécula en cuestión. El grado de protección se mide con un medidor de fluorescencia y se cuantifica en "equivalentes de Trolox" (TE) (Ou, et al., 2002; Huang et al., 2005).

Este ensayo utiliza la proteína β-ficoeritrina fluorescente como un sustrato oxidable y AAPH (2, 2-azobis (2 amidino-propano) dihidrocloruro), como generador de radicales peroxilo o como generador de radicales hidroxilos (Figura 1-10). 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 Standard de referencia porque el mismo Trolox

puede interaccionar como pro-oxidante con el cobre. Utiliza la técnica del área bajo la curva de descenso para la cuantificación (AUC). Por lo tanto combina tanto el porcentaje de inhibición como el periodo de inhibición a lo largo del tiempo producido por los antioxidantes en estudio. Este ensayo es adaptado para medir antioxidantes tanto lipofilicos como hidrofílicos (Prior et al., 2005; Zuleta et al., 2009).

Figura 1-10: Reacción del radical AAPH durante el ensayo ORAC



1.4.3. Contenido total de fenoles (Folin Ciocalteu)

El método de Folin Ciocalteu ha sido usado por muchos años para determinar el contenido total de fenoles (CTF) en productos naturales, mediante una reacción oxidación/reducción. El método original fue desarrollado en 1927 para análisis de tirosina, en el cual la oxidación de fenoles por el reactivo molibdotungstato lleva a un producto coloreado con una longitud de onda máxima a 745-750 nm (Figura 1-11).

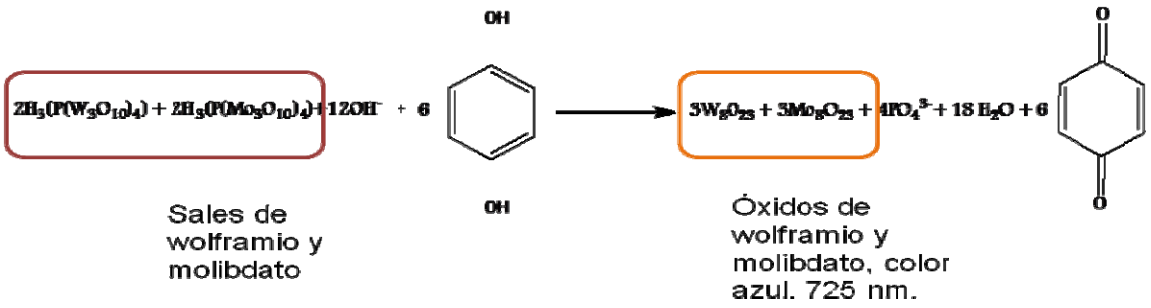
$$Na_2WO_4/Na_2MoO_4 \rightarrow (\text{fenol} - MoW_{11}O_{40})^{-4}$$

$$\text{Mo (VI) (amarillo)} + e^- \text{ (AH)} \rightarrow \text{Mo (V) (Azul)}$$

Es la oxidación de los grupos fenólicos (R-OH) con una mezcla de ácido fosfotungsténico ($H_3PW_{12}O_{40}$) y ácido fosfomolibdénico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) (Prior et al., 2005). La reducción concomitante del reactivo de Folin-Ciocalteu origina un color azul en la muestra que es

proporcional al CTF y se expresa como miligramos de ácido gálico/ g de aceite esencial (mg AG/g de AE).

Figura 1-11: Reacción del método de Folin - Ciocalteu para la cuantificación de los compuestos fenólicos.



Algunos estudios de determinación de actividad antioxidante han sido llevados a cabo en diferentes especies de *Lippia,* entre ellos, Damasceno et al. en aceite esencial de *L. grandis,* obtenido por hidrodestilación de hojas y tallos, evaluó la capacidad antioxidante por medio de las técnicas DPPH, $ABTS^{\cdot+}$ y blanqueamiento del β-caroteno (2011); en el mismo sentido, el trabajo de Acevedo et al. determinó la capacidad de atrapamiento del catión-radical $ABTS^{\cdot+}$ en aceites esenciales de *L. origanoides* y L. *micromorera*, obtenidos mediante hidrodestilación asistida por microondas, cabe señalar que dichas especies fueron cultivadas en el departamento de Santander (2007). De la misma manera Celis evaluó la actividad antioxidante por medio de DPPH, también de aceites esenciales de especies cultivadas en Santander (cultivos experimentales del CENIVAM), de las partes aéreas (hojas, tallos e inflorescencias) (2007); tanto Celis como Castañeda determinaron la actividad antioxidante mediante DPPH y $ABTS^{\cdot+}$ en aceites esenciales de especies del Cañon del Río Chicamocha, Bolivar, Sucre, Meta y Cesar (2007).

Teniendo en cuenta la revisión bibliográfica anterior, el presente trabajo determinó el efecto del método de obtención sobre la composición y la actividad antioxidante de los extractos de oregano de monte (*L. origanoides*) del Alto Patía; por otra parte, de manera preliminar, se planteó una posible aplicación de dicho extracto. De tal forma, se plantearon los siguientes objetivos:

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Determinar el efecto del método de obtención de extractos de aceites esenciales (AE) de *Lippia origanoides* Kunth del Alto Patía sobre su composición y la actividad antioxidante de los mismos.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar la composición química de los extractos de aceite esencial de *L. origanoides* obtenidos por diferentes métodos de extracción.
- Evaluar mediante diferentes métodos la actividad antioxidante en cada uno de los extractos obtenidos.
- Establecer un proceso de obtención de aceite esencial de orégano con alto rendimiento y alta actividad antioxidante.
- Correlacionar los métodos de extracción con la composición relativa de los AEO y su efecto sobre la capacidad antioxidante.
- Evaluar el efecto inhibidor de los AEO sobre la oxidación lipídica en huevos de ponedoras suplementadas con AEO.

3. Metodología

tres métodos de extracción; arrastre con vapor (AV), hidrodestilación (HD) y extracción con fluidos supercríticos (EFS) (EFS 110 bar 40 °C, EFS 110 bar 50 °C, EFS 110 bar 60 °C) y la determinación de los respectivos rendimientos; (2) el análisis composicional de los extractos por medio de CG-EM; (3) la evaluación de la actividad antioxidante de cada extracto mediante las técnicas DPPH, FRAP, ORAC y BET, así como la determinación del CTF, (4) se realizó la correlación entre las variables método de extracción - actividad antioxidante, composición química - actividad antioxidante y su posible incidencia sobre la capacidad antioxidante y (5) se hizo el ensayo de TBARS para observar el efecto del AEO sobre la estabilidad oxidativa de la yema del huevo.

3.1. Material vegetal

La recolección del material vegetal fue realizada en el Corregimiento de San Juanito, vereda Alto de Mayo del área subxerofítica denominada Cordón Panamericano del Alto Patía, ubicada a una altura de 1174 m.s.n.m, en los municipios de Taminango, norte de Nariño y Mercaderes, sur del Cauca. N: 1° 41´ 49,7´´, W: 77° 17´ 42,8´´ (Figura 3-1 y 3-2), cabe mencionar que dicho material silvestre no ha sido estudiado anteriormente, en cuanto a la actividad antioxidante.

El material vegetal fue recolectado entre las hileras uno y diez de la planta, contadas de abajo hacia arriba, sin cortar la rama, con el objeto de no destruir la planta, en etapa madura. Una vez el material vegetal fue colectado, se sometió a un proceso de secado natural, protegido del sol y del agua, en un lugar aireado por 10 días. Para obtener los extractos de *L. origanoides* Kunth se obtuvieron a partir de material vegetal con una humedad relativa del (12%) y las hojas fueron picadas para aumentar el área de contacto.

Figura 3-1: Ubicación de la microrregión del Alto Patía

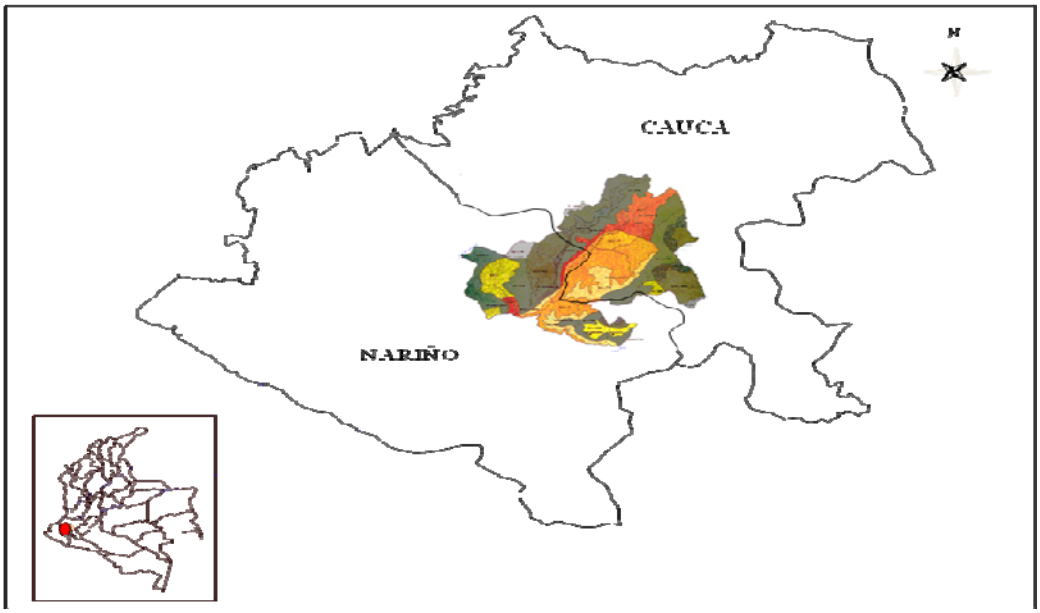
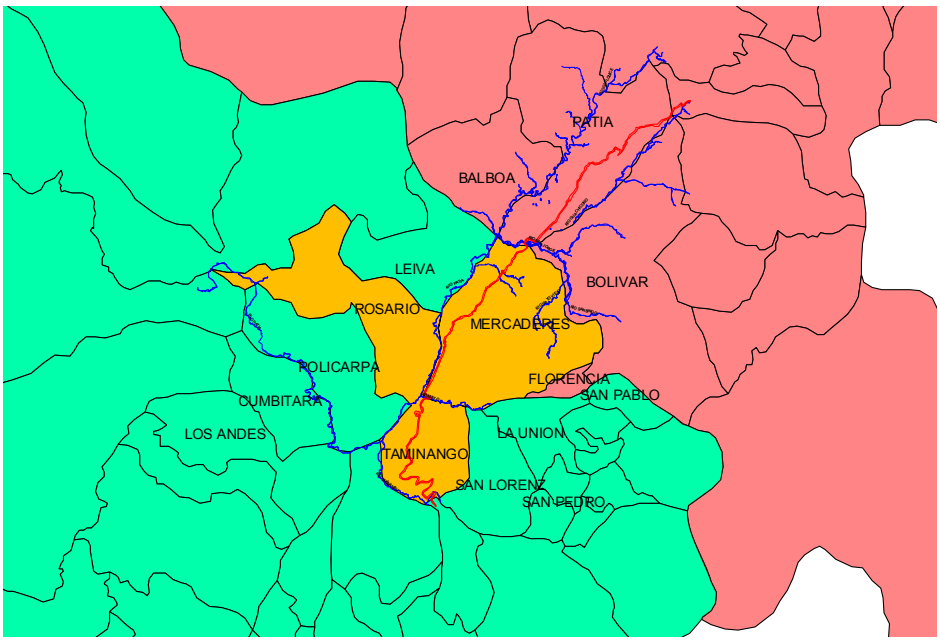


Figura 3-2: Cordón Panamericano del Alto Patía



La muestra, hojas maduras de plantas de orégano de monte *(Lippia origanoides* Kunth*)* (Figura 3-3), fue clasificada taxonómicamente por Luis Eduardo Forero P. Biólogo-Botánico, director del Herbario José Cuatrecasas Arumí, de la Universidad Nacional Sede Palmira y se describe en detalle en la Tabla 3-1.

Figura 3-3: Muestra vegetal *Lippia origanoides* Kunth, (A) Muestra fresca, (B) Muestra madura seca

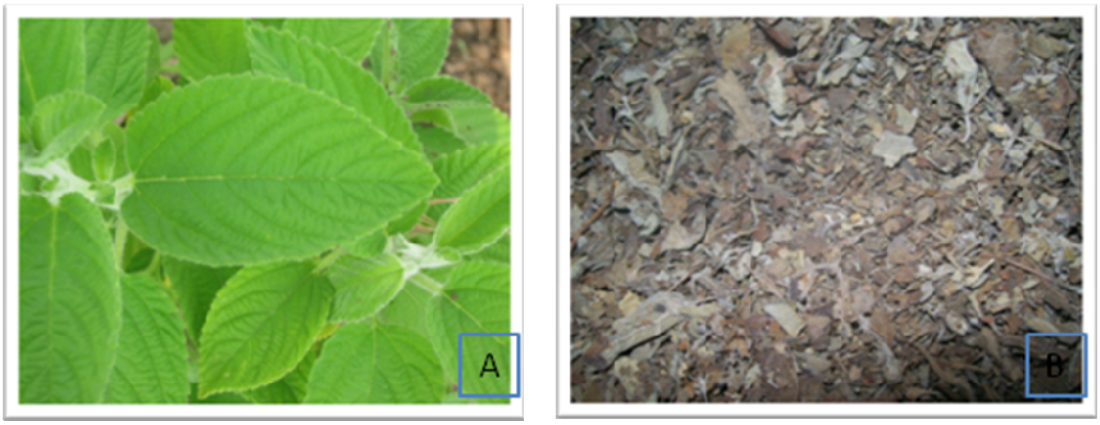


Tabla 3-1: Clasificación taxonómica de *Lippia origanoides* Kunth

Dominio	*Eukaryota* Whittaker & Margulis, 1978- eukaryotes
Reino	*Plantae* Haeckel, 1866 – plantas
Subreino	*Viridaeplantae* Cavalier-Smith, 1981 – plantas verdes
Phylum	*Tracheophyta* Sinnott, 1935 ex Cavalier-Smith, 1998 – plantas vasculares
Subphylum	*Spermatophytina* (auct.) Cavalier-Smith, 1998 – plantas de semilla
Infraphylum	*Angiospermae* auct
Clase	*Magnoliopsida* – Brongniart, 1843- dicotiledóneas
Subclase	*Lamiidae* Takhtajan ex Reveal, 1992
Superorden	*Lamianae* Takhtajan, 1967
Orden	*Lamiales* Bromhead, 1838
Familia	*Verbenaceae* (ver-be-NAY-see-ay) Jaume Saint- Hilaire, 1805, nom. Cons
Tribu	*Lantaneae*
Género	*Lippia* (LIP-pee-uh) Linnaeus, 1753- Lippia
Epìteto especìfico	*origanoides* Kunth
Nombre botânico	*Lippia origanoides* H.B. & K

3.2. Evaluación de métodos de extracción del aceite esencial

Los métodos de extracción que se emplearon fueron arrastre con vapor (AV), hidrodestilación (HD) y extracción con fluidos supercríticos (EFS) y en cada extracto se

determinó su rendimiento (peso del extracto obtenido sobre el peso de material vegetal utilizado por 100), composición, capacidad antioxidante y contenido total de fenoles.

3.2.1. Extracción por arrastre con vapor

Para el proceso de extracción se utilizó aproximadamente 1000 g de hojas y fue realizada en un equipo de acero inoxidable semi-industrial de capacidad de 5 kilos, ubicado en el Laboratorio de Productos Naturales Vegetales de la Universidad Nacional de Colombia (Figura 3-4).

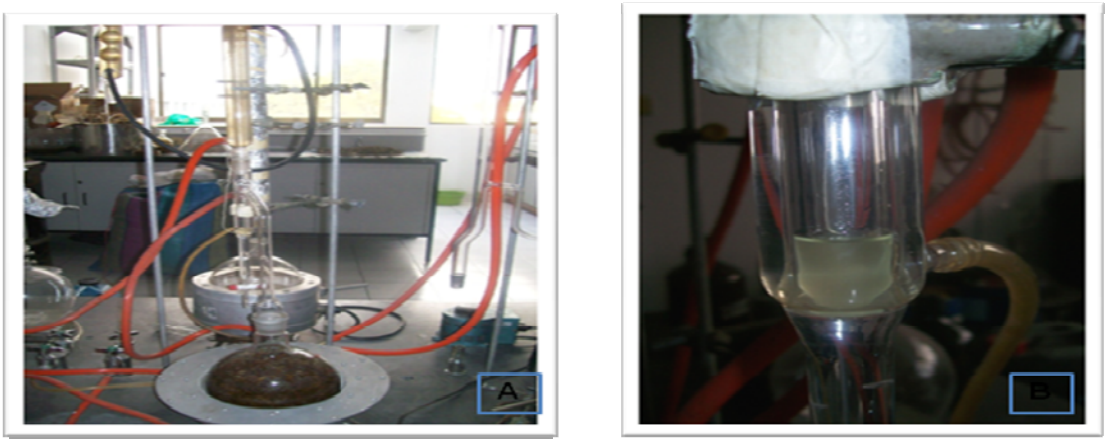
Figura 3-4: Equipo de Arrastre con vapor del Laboratorio de Productos Naturales Vegetales. (A) Vista general: (generador de vapor de agua, alambique o extractor, cuello de cisne y condensador), (B) Dispositivo en U para recolección del aceite esencial.

El tiempo de extracción fue de 2 horas y este procedimiento se llevó a cabo por triplicado. El aceite esencial (AE) fue secado con sulfato de sodio anhidro y filtrado, para evitar su daño por humedad. Posteriormente, el AE fue pesado en balanza, los pesos se promediaron y el rendimiento (%) se calculó con base en el peso del material vegetal inicial. Finalmente fueron almacenados a 4°C y protegidos de la luz para su posterior análisis.

3.2.2. Extracción por hidrodestilación

Para la extracción por éste método se empleo el material vegetal de un peso aproximado de 200 g en un balón de 4 L con 2 L de agua destilada. Se usó un equipo tipo Clevenger con reservorio de destilación tipo *Dean-Stark*, ubicado en el Laboratorio de Productos Naturales Vegetales (Figura 3-5).

Figura 3-5: Equipo de Hidrodestilación del Laboratorio de Productos Naturales Vegetales, (A) tipo Clevenger, (B) Reservorio de destilación tipo *Dean-Stark*

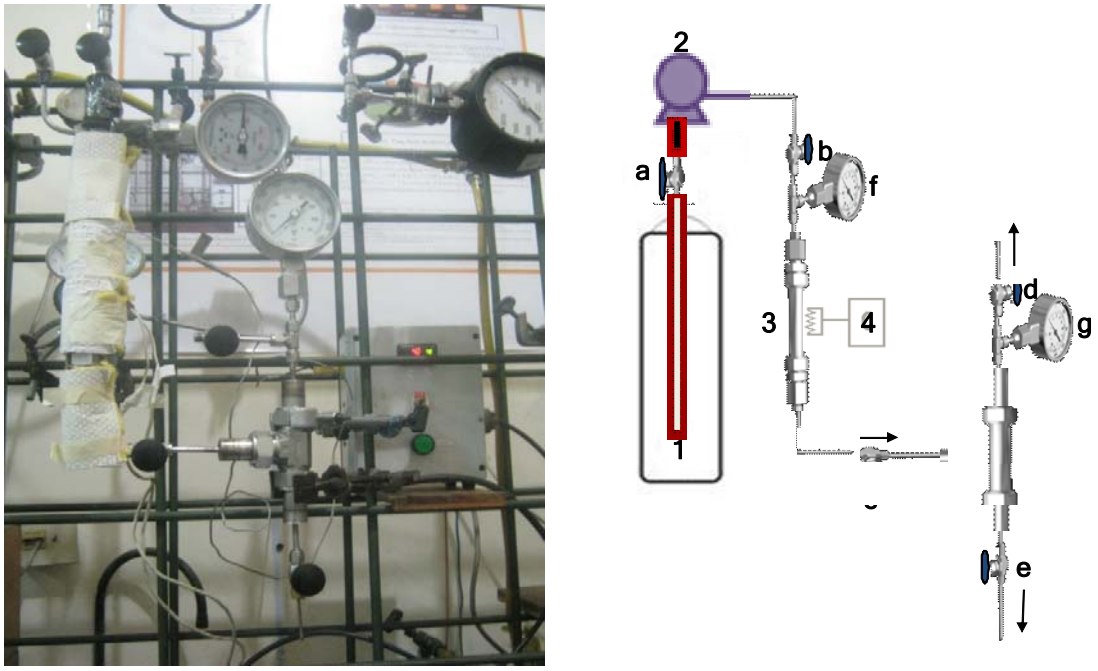


El tiempo de extracción fue de 2 horas y este procedimiento se llevó a cabo por triplicado. Con el fin de eliminar impurezas y agua residual, el aceite esencial fue filtrado a través de sulfato de sodio anhidro y posteriormente fue pesado y el rendimiento de la extracción se determinó con base en el peso inicial del material vegetal inicial. Finalmente fue almacenado para su análisis.

3.2.3. Extracción con fluido supercrítico (EFS)

Las extracciones fueron llevadas a cabo empleando un sistema EFS que se ilustra en la Figura 3-6 diseñado y ensamblado en el Laboratorio de Alta Presión (Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá) (Castro et al, 2010, 2011). Este equipo fue empleado para hacer extracciones empleando CO_2 supercrítico en modo estático. En la construcción del sistema se emplearon accesorios de acero inoxidable 316 y 316L (férulas, contraferulas, tubbings, tubos, conexiones tipo OD y NPT, válvulas, entre otros).

Figura 3-6: Diseño del equipo de extracción para fluidos supercríticos



Este consta de un tanque de CO_2 (**1**), bomba neumática (marca HASKEL, modelo AGT-7/30) (**2**), una celda de extracción (50cm^3) (**3**), termocupla tipo K (WATLOW serie SD 31, MI, USA, ±1 ◦C) conectada a la celda de extracción la cual es calentada a 300W (**4**), recipiente separador (150cm^3) (**5**), El flujo fue controlado por válvulas (WHITEY® serie SS-1VS4 y SS-1VR4, OH, USA) (**a**–**e**) y el sistema de presión fue monitoreado por manómetros analógicos (BOURDON HAENNI®, Tipo M1 11963, 70 MPa, ó Vendôme cedex,Francia, 700 bar) (**f**–**g**).

Las condiciones de extracción empleadas fueron 110 bar de presión y 40, 50, 60°C de temperatura (Nada, 2010). El procedimiento de extracción consistió en situar la muestra dentro de la celda de extracción (5 g para cada ensayo) y someterla a las diferentes condiciones de extracción por 90 min (extracto uno 110 bar–40 °C; extracto dos 110 bar–50 °C; extracto tres 110 bar–60 °C). Este tiempo fue dividido en seis etapas de extracción de 15 min (modo estático) para asegurar una mayor extracción; en cada una de las etapas se realizó el proceso de extracción/despresurización para cada muestra dentro del extractor, recolectando el extracto en un solo vial. Todas las extracciones fueron realizadas por triplicado.

3.3. Caracterización química del aceite esencial y fraccionamiento

El análisis de las muestras de AE de *L. origanoides* se realizó mediante CG-EM, empleando una columna medianamente polar y una columna polar. Adicionalmente, el extracto más activo se fraccionó mediante cromatografía de columna flash (CCF). Por otra parte, se analizó por CG-EM un AE comercial de *Oreganum vulgare* sp *Hirtum.*

3.3.1. Cromatografía de gases – espectrometría de masas

El análisis de los aceites esenciales extraídos se realizó por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, en un equipo Agilent Technologies 6890 Plus acoplado a un detector selectivo de masas (MSD, Agilent Techonologies 5973), operado en el modo barrido completo de radiofrecuencias (full scan). Para el análisis se empleó una columna medianamente polar DB-5MS (J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.) (5%-fenil-poli(dimetilsiloxano), 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm), con un programa de temperatura desde 45 ºC (5 min) hasta 150 ºC (2 min) a una rampa de 4 ºC/min, luego, se incrementó hasta 250 ºC (5 min) a 5 ºC/min, finalmente, la temperatura aumentó a una rampa de 10 ºC/min hasta alcanzar 275ºC (15 min). Una segunda columna fue empleada DB-WAX [(polietilenglicol), 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm)], con un programa de temperatura desde 45 ºC (5 min) hasta 150 ºC (3 min) a una rampa de 3 ºC/min, luego, se incrementó hasta 220 ºC (5 min) a 4 ºC/min. La inyección se realizó en modo split y un volumen de inyección de 2 µL.

La identificación de los metabolitos secundarios volátiles se llevó a cabo usando criterios cromatográficos y espectrométricos.

Parámetros cromatográficos: Utilizando los tiempos de retención (t_R) de los compuestos se calcularon los índices de retención de Kovàts (I_k) (Kováts, 1965), éstos se calcularon teniendo en cuenta los t_R de la serie homóloga de parafinas lineales desde C_{10} hasta C_{25} corridas bajo los mismos parámetros operacionales utilizados para los AE y extractos. Para su cálculo se utilizó la siguiente ecuación:

$$I_k = 100 \times n + 100\left[\frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}}\right] \qquad \textbf{Ecuación 1}$$

Donde ***n***<***N*** y:

n= Número de átomos de carbono del hidrocarburo que eluye antes del compuesto de interés;

t_{Rx}= Tiempo de retención del compuesto de interés (min);

t_{Rn}= Tiempo de retención del hidrocarburo que eluye antes del compuesto de interés (min);

t_{RN}= Tiempo de retención del hidrocarburo que eluye después del compuesto de interés (min).

Los I_k calculados para las fases estacionarias polar y apolar se compararon con los I_k reportados en la literatura (Adams, 2007). Además, se compararon los t_R de algunos compuestos presentes en los extractos, con los t_R de sustancias de referencia, (patrones de terpenos certificados, Sigma-Aldrich) que se corrieron bajo los mismos parámetros cromatográficos operacionales (timol, carvacrol, ρ-cimeno, óxido de cariofileno, limoneno, linalool, α-pineno, 1,8-cineol, entre otros).

Parámetro espectrométrico: El espectro de masas que fue obtenido de cada uno de los compuestos presentes en los extractos y fracciones, se compararon con los almacenados en las bases de datos NIST 02, Wiley 138K o Adams, 2007. Esta última especializada en terpenos y otros compuestos presentes en los AE y extractos de diferentes plantas.

3.3.2. Fraccionamiento del aceite esencial

Se realizó el procedimiento de fraccionamiento según la metodología de Kulisic et al. (2004) y Mastelic et al. (2005). El aceite esencial se fraccionó mediante la técnica de cromatografía de columna flash (CCF) en sílica gel 60 Merck (230 - 400 mesh), de 1 cm de diámetro y 50 cm de longitud. Con la CCF se obtuvieron dos fracciones una en pentano (fracción 1) y la otra en éter dietílico (fracción 2). Dichas fracciones fueron monitoreadas por cromatografía en capa delgada (CCD) en cromatofolios Merck KGaA® (Darmstadt, Alemania) de sílica gel $60F_{254}$ de 20 x 20 cm y 0,20 mm de espesor, mediante la utilización de una fase móvil de n-hexano para la fracción 1 y n-hexano: acetato de etilo 85:15 (v/v) para la fracción 2. Como reveladores de las cromatofolios se utilizó una cámara saturada con vapores de I_2, vainilla/H_3PO_4 y una lámpara UV de (254 y 365 nm).

3.4. Evaluación de la actividad antioxidante de los aceites esenciales de *Lippia origanoides*

Para el estudio de la posible actividad de los extractos obtenidos, se utilizaron las metodologías de transferencia de electrones (DPPH, FRAP) y átomos de hidrógeno (ORAC y blanqueamiento del β-caroteno), finalmente se evaluó el contenido de fenoles totales. La capacidad antioxidante de los extractos en estudio se compararon contra el aceite esencial comercialmente utilizado de *Oreganum vulgare* sp *hirtum* (distribuido por Ralco Nutrition, obtenido por AV), un antioxidante sintético como el BHT (2,6-Di-tert-

Butyl-p-cresol), 99%, Sigma B1378) y un estándar de timol al 99,5% marca Sigma T0501.

3.4.1. Ensayo actividad antiradicalaria DPPH

El método DPPH, fue realizado según la metodología de Thaipong et al. (2006). Se preparó una solución de DPPH 0,1 mM en etanol con una absorbancia de 1,100. Una alícuota de 975 µL de esta solución se incubó a temperatura ambiente durante 7 min y se midió la absorbancia inicial a 515 nm. Luego se adicionaron 25 µL del extracto y/o estándar y se incubó a temperatura ambiente; tomándose medidas de absorbancia cada 10 minutos durante 2 horas. Para construir la curva de calibración se adicionaron 25 µL de soluciones de Trolox en etanol entre 0 - 5000 µM a la solución de DPPH. El porcentaje de inhibición del DPPH ocasionado por el antioxidante se calculó de la siguiente forma:

$$\%\ Inhibición = \frac{A_{515\ nm\ Inicial} - A_{515\ nm\ Final}}{A_{515\ nm\ Inicial}}\ x\ 100 \qquad \textbf{Ecuación 2}$$

La actividad antioxidante fue expresada como la capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC) expresada como mmoles Trolox/ mg de extracto. Las medidas fueron realizadas por triplicado.

3.4.2. Evaluación del poder de reducción FRAP

El poder de reducir FRAP se realizó mediante la metodología de Benzie y Strain (1996), utilizando un lector de microplatos multidetección Sinergy HT. Primero se adicionó a todos los pozos de la placa, 200 µL de la solución de trabajo TPTZ (2, 4, 6-tripiridil-s-triazina) precalentada a 37°C. Posteriormente se adicionó una alícuota de 50 µL de muestra, blanco y estándares y la lectura se realizó a 593 nm durante 2 h cada minuto. Se elaboró la curva de calibración del trolox con el dato de la diferencia entre la lectura inicial y la final. Los datos obtenidos de la diferencia entre las lecturas de absorbancia de las muestras se interpoló en la curva de trolox y se expresó finalmente en mmoles de trolox / mg de extracto.

3.4.3. Ensayo de la capacidad de absorbancia del radical oxígeno (ORAC)

El procedimiento experimental fue realizado según lo expuesto por Andre et al. (2007) y Prior et al. (2003). Se prepararon las soluciones de Trolox en concentraciones de 5 a 40 µM, se tomaron 25 µL de las diluciones del estándar, muestra o blanco y se adicionó 250 µL solución de fluoresceína 55 nM en PBS 7,5 mM pH 7,4. Se incubó por 20 min a 37 °C

+/-2 °C. Se adicionó 25 µL de Solución de AAPH 153 mM en PBS 7,5 mM pH 7,4. Luego se hizo mediciones cada minuto durante una hora.

El efecto protector del antioxidante fue calculado usando las diferencias de áreas bajo la curva de decaimiento de la fluoresceína entre el blanco y la muestra, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$ORAC = \frac{(AUC - AUC^0)}{(AUC_{Trolox} - AUC^0)} f[Trolox]$$

Ecuación 3

Donde AUC es el área bajo la curva de la muestra, AUC° 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. Se interpoló en la curva del Trolox y se expresó en mmoles de trolox/mg de extracto.

3.4.4. Ensayo blanqueamiento del β-caroteno (BET)

La actividad antioxidante de los extractos, mediante la prueba de blanqueo del β-caroteno, fue determinado usando la metodología de Saccheti et al. (2005) y Velioglu et al. (1998). Se tomó 500 µL de una solución de β-caroteno en acetona 1,2 mg/mL, se adicionó en un tubo de capacidad de 50 mL ámbar y se evaporó la acetona a temperatura ambiente. Se adicionó 20 µL de ácido linoleico, 200 µL de Tween 40 y 200 µL del extracto, seguido de 50 mL de agua desionizada saturada con oxígeno mediante burbujeo de aire durante 12 h, se agitó fuertemente, se sometió a un baño de ultrasonido de 36 kHz durante 10 min y se incubó a 50 °C durante 2 h con agitación constante y varios periodos de 2 min en un baño de ultrasonido para promover la formación de la micela. Se leyó la absorbancia a 470 nm cada 10 min durante 2 horas, utilizando como blanco una emulsión sin β-caroteno. La muestra control contenía 200 µL de metanol en lugar del aceite esencial. La actividad antioxidante será expresada como porcentaje inhibido con referencia al control después de la incubación de las 2 horas con la siguiente ecuación:

$$\%AA = 100(DRC - DRS)/DRC$$ **Ecuación 4**

donde AA = es la actividad antioxidante, DRC = tasa de degradación del control = [ln(a/b)/120]; DRS = tasa de degradación en presencia de la muestra = [ln(a/b)/120]; a = absorbancia a tiempo 0; b = absorbancia a los 120 min. Los valores obtenidos se compararon contra la curva de α-tocoferol y se expresó en mmoles de α-tocoferol /mg de extracto.

3.5. Contenido total de fenoles

El contenido total de fenoles se determinó de acuerdo al método adaptado de Chun et al. (2005); 1 mL de aceite esencial se mezcló con 1 mL de etanol 95%, 5 mL de agua y luego 0,5 mL de 1 N Folin Ciocalteu. Después de 5 min, se adicionó 1 mL 5% Na_2CO_3, se mezcló y se dejó en reposo por 1 hora. Se leyó la absorbancia a 725 nm. La curva del estándar de ácido gálico fue entre 25 – 150 µg/mL en etanol (95%).

3.6. Análisis estadístico

Los datos fueron sujetos a una exploración previa de supuestos de aleatoriedad, normalidad y se realizaron análisis de varianzas para establecer diferencias entre el rendimiento de los diferentes métodos de extracción y capacidad antioxidante.

Los datos fueron analizados con el PROC GLM del paquete estadístico SAS v. 9.2, mediante un diseño completo al azar, denotado como:

$Y_{ij} = \mu + \tau_j + e_{ij}$

Donde:

Yij = Variable de respuesta: Extracto más activo (Respuesta del i-ésimo individuo en el j-ésimo tratamiento)

µ = Promedio general

τ_i = Efecto j-ésimo tratamiento; donde cada tratamiento es un método de extracción

e_{ij} = Error experimental (Error del i-ésimo individuo en el j-ésimo tratamiento)

Donde j corresponde al número de tratamientos (DPPH, FRAP, ORAC, BET, CTF y Rendimiento.

Donde i corresponde al número de réplicas en cada uno de los tratamientos (3 réplicas).

En los casos donde se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos se realizó una prueba de separación de medias mediante Tukey (Chew, 1976), con una significancia del 5%.

Para evaluar la asociación entre las diferentes técnicas de actividad antioxidante se realizó un análisis de correlación:

$r(X_i, Y_j)$

Donde r corresponde al coeficiente de correlación entre las variables evaluadas y (Xi, Yi) corresponde a las variables correspondientes a las técnicas de actividad antioxidante. El análisis se realizó mediante el procedimiento PROC CORR del del paquete estadístico

SAS v. 9.2. Estas correlaciones entre los datos fueron calculados usando el coeficiente de correlación de Pearson´s.

Para determinar el efecto de la composición química del extracto sobre la capacidad antioxidante, se realizó un análisis de regresión lineal múltiple mediante el procedimiento PROC REG del paquete estadístico SAS v. 9.2, aplicando el procedimiento "Forward Stepwise" (Draper y Smith, 1981; Miller y Miller, 2002).

$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_n X_n$.

Donde:

β_0 = Intercepto cuando $X_n = 0$

$\beta_1 \ldots \beta_n$= Coeficientes de regresión

$X_1 \ldots X_n$= Componentes

Debido al amplio número de compuestos presentes en los extractos, se realizó un análisis de componentes principales, con el fin de establecer los compuestos que presentaron mayor variación en la composición relativa de cada extracto.

3.7. Aplicación promisoria del AEO

Como una posible aplicación del AEO, se estudió el efecto del AEO sobre la inhibición de la oxidación lipídica en huevos frescos y almacenados durante 6 meses a 4 °C y - 10 °C. Para dichos ensayos se empleó el AEO obtenido por HD debido a su fácil disponibilidad.

Para esta parte del trabajo se contó con la participación de un joven investigador financiado por COLCIENCIAS (el Zootecnista Ronnal Ortíz). El objetivo de este ensayo fue evaluar la estabilidad oxidativa de huevos enriquecidos con aceite de pescado y palma, almacenados a 4 °C y -10 °C, frente a antioxidantes naturales provenientes del aceite esencial de orégano con diferentes niveles. El experimento se llevó a cabo en las instalaciones avícolas de CORPOICA, ubicado en el municipio de Mosquera (Cundinamarca) a 2650 m.s.n.m, con una temperatura promedio de 14,5% y humedad relativa promedio de 76%.

3.7.1. Animales y dieta

Se utilizaron 160 ponedoras de la estirpe Babcock Brown de 40 semanas de edad alojadas en jaulas de postura. Las aves fueron distribuidas al azar en 8 tratamientos, con 10 réplicas de dos ponedoras cada una. Los tratamientos se basaron en dietas comerciales maíz-soya con una inclusión de 2% de aceite de palma o de pescado; en ambos casos se realizó la suplementación con el AEO usando tres niveles diferentes de timol (alto, medio y bajo) como antioxidante natural (Tabla 3-2). Diariamente se ofrecieron 120 g/ave de alimento en harina (2,8 Mcal/Kg de energía metabolizable aparente

corregida por nitrógeno-EMAn, 19% de proteína cruda-PC y 4,2% de calcio-Ca); el suministro de agua durante el ensayo fue a voluntad. Las dietas se formularon de acuerdo a los requerimientos nutricionales establecidos para ponedoras, mediante el software UFFDA; la matriz de formulación usada estaba compuesta por materias primas de uso comercial.

Las dietas se elaboraron en baches de 400 kg mediante la mezcla de un núcleo que incluía todas las materias primas, excepto la torta de soya, el aceite de palma o pescado y la mezcla de AEO, en los casos que debía ser incluido. El núcleo se dividía en grupos de 40,14 kg, a cada uno de éstos se le agregaban 8,86 kg de torta de soya – 49% y un litro de aceite de palma o pescado según el caso, en los casos que correspondía se le adicionaba la mezcla del AEO. Las proporciones del AEO adicionado a la mezcla para obtener los tres niveles de timol deseados se calcularon en base a la composición de los aceites de orégano (*Lippia origanoides* - *Oreganum vulgare*), considerando específicamente el carvacrol (C) y timol (T), como componentes principales de estos dos aceites esenciales.

Los tratamientos experimentales fueron:

1. Aceite de palma sin AEO (PAL)

2. Aceite de palma suplementada 200 ppm + Bajo timol (PAL - BT)

3. Aceite de palma suplementada 200 ppm + Medio timol (PAL - MT)

4. Aceite de palma suplementada 200 ppm + Alto timol (PAL - AT)

5. Aceite de pescado sin AEO (PES)

6. Aceite de pescado suplementada 200 ppm + Bajo timol (PES - BT)

7. Aceite de pescado suplementada 200 ppm + Medio timol (PES - MT)

8. Aceite de pescado suplementada 200 ppm + Alto timol (PES - AT)

Tabla 3-2: Dieta comercial (Porcentaje de inclusión de los ingredientes)

Ingrediente	Aceite de palma		Aceite de pescado	
	Sin AEO	Con AEO	Sin AEO	Con AEO
Maíz	48,69	48,69	48,69	48,69
Harina arroz	8,0	8,0	8,0	8,0
Torta soya-49%	17,72	17,72	17,72	17,72
Soya extruida	10,0	10,0	10,0	10,0
Harina pescado	1,0	1,0	1,0	1,0
Aceite palma	2,0	2,0	-	-
Aceite pescado	-	-	2,0	2,0
Carbonato de Calcio	9,29	9,29	9,29	9,29
Fosfato tricálcico	1,71	1,71	1,71	1,71
Sal	0,3	0,3	0,3	0,3
Bicarbonato de sodio	0,4	0,4	0,4	0,4
DL-Metionina	0,17	0,17	0,17	0,17
Cloruro de colina 60%	0,08	0,08	0,08	0,08
Premezcla ponedora	0,6	0,6	0,6	0,6
AE de *O. vulgare*				
AE de *L. origanoides*				

3.7.2. Recolección de muestras

Cada tratamiento fue distribuido al azar y diariamente se suministraba 120 g de alimento por ponedora (240 g/jaula) en horas de la mañana y 4 g de carbonato de calcio por ave en horas de la tarde (Figura 3-7). Para la valoración del efecto antioxidante en la yema de huevo, se realizó un muestreo a la semana 48 del ensayo, en éste se seleccionaron tres huevos de peso promedio en cada una de las replicas de los 8 tratamientos; uno de los huevos en cada réplica fue liolifilizado y luego se realizó la valoración de sustancias reactivas al TBA. Los 2 huevos restantes en cada réplica fueron almacenados 1 a 4 ºC y 1 a -10 ºC, respectivamente para valorar el efecto de la temperatura de almacenamiento (6 meses) sobre la estabilidad lipídica.

Figura 3-7: Pesaje y distribución del alimento para ponedoras de la estirpe Babcock Brown.

3.7.3. Determinación de la oxidación lipídica mediante el análisis de substancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Se realizó el análisis de TBARS mediante la metodología de Botsoglou et al. (1994 y 1997). Se tomó 1 g de muestra liofilizada, se adicionó 9 mL de la solución TCA 5% y 5 mL de solución BHT 0.8%, posteriormente se homogenizó la muestra. La fase de orgánica se descartó y en seguida se tomó una alícuota de 2,5 mL de la fase acuosa, luego se adicionó 1,5 mL de TBA 0.8%, posteriormente se incubó por 30 min a 70 ºC. Al cabo de este tiempo se paró la reacción en un baño de agua fría, se agitó y se realizó la lectura a 532 nm. Los resultados fueron expresados como mg de malonaldehído por gramo de yema liofilizada (mg MDA/g).

3.7.4. Análisis estadístico

Para evaluar el efecto del tipo de aceite, la suplementación con el AEO con diferentes niveles de timol, la temperatura de almacenamiento o la interacción de los tres factores sobre la estabilidad oxidativa de las yemas de huevo, se usó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3x2x4 y se usaron contrastes ortogonales, con el fin de comprender el efecto de la interacción de los factores evaluados sobre el contenido de MDA en las yemas de huevo analizadas. Los datos fueron analizados por ANOVA usando el procedimiento GLM de SAS (SAS versión 9.2).

El arreglo factorial 3x2x4 correspondió a: tres tipos de almacenamiento (fresco, 4 °C y -10 °C), dos tipos de aceite vegetal (palma y pescado) y cuatro niveles de adición de timol (nulo, bajo, medio y alto).

4. Resultados y discusión

4.1 Rendimientos de los extractos de *L. origanoides* obtenidos por diferentes métodos de extracción

Todos los extractos se obtuvieron utilizando los diferentes métodos de extracción, bajo las condiciones descritas en los numerales 3.2.1, 3.2.2 y 3.2.3. En la Tabla 4-1 se reportan los rendimientos de cada uno de los extractos con base en el peso inicial del material vegetal.

Tabla 4-1: Rendimientos de los extractos obtenidos de *Lippia origanoides* Kunth en cada método de extracción

EXTRACCION	RENDIMIENTO[1]
AV	2,88 ± 0,11 [bc]
HD	3,00 ± 0,08 [b]
EFS 110 bar – 40 °C	2,96 ± 0,11 [b]
EFS 110 bar – 50 °C	3,84 ± 0,24 [a]
EFS 110 bar – 60 °C	2,56 ± 0,05 [c]

[1] Promedio ± D.E (n=3), expresado en base a material vegetal seco (%)

[a,b,c] Medias con letras diferentes indican diferencias significativas (P<0,05)

El método de extracción por arrastre con vapor presentó el más bajo rendimiento (2,88%), continua en orden ascendente el método por hidrodestilación (3,00%) y EFS 110 bar – 50 °C con el dato más alto de 3,84%.

Dentro de las diferentes temperaturas de extracción en EFS, el extracto obtenido por EFS 110 bar–50 °C presentó el mayor rendimiento de extracción (3,84%), seguido en orden descendente EFS 110 bar - 40 °C (2,96%) y el rendimiento más bajo el EFS 110 bar- 60 °C (2,56%). Se observa que en este método de extracción el mayor rendimiento se obtuvo en función del cambio de temperatura para el caso de 40 °C a 50 °C, que puede ser explicado por la disminución en la densidad del fluido supercrítico llevando esencialmente a una mayor solubilidad del extracto en el solvente (Luque de Castro, et al., 2006). Sin embargo, dicho comportamiento no se mantiene con un posterior aumento

de temperatura de 50 °C a 60 °C, porque continua la disminución en la densidad del CO_2 y por tanto la solubilidad disminuye.

En este orden de ideas, en general los resultados obtenidos muestran valores acordes a los reportados por otros autores. Kulisic, et al. evaluaron un aceite de orégano obtenido mediante hidrodestilación reportando un rendimiento del 2,9% (2004). En el estudio realizado por Dos Santos, et al. obtuvieron un rendimiento de 4,6% (p/p) de *L. origanoides* en tres localidades del Brasil (2004). En otra especie del mismo género *Lippia* se encontraron rendimientos del 4,3% (Rocha et al., 2007), mientras que Acevedo et al. obtuvieron un rendimiento mucho más bajo (2,3%) por el método de hidrodestilación asistida por radiación de microondas (2007). En la investigación por Escobar et al. en *L. origanoides* colectada del Cauca, Mercaderes obtuvieron un rendimiento del 2% (2010). Igualmente en otros quimiotipos de *L. origanoides* reportadas por Stashenko, et al. a una altura de 850 m.s.n.m, se encontraron rendimientos entre 2,4 - 3,1 %, los cuales varían según donde se cultivan (2010).

4.2. Caracterización química de los extractos obtenidos

En la Tabla 4-2 se registran los componentes aislados e identificados por CG-EM, según el orden de elución en la columna DB5 (cantidad relativa, >0,01%), junto con los índices de Kovats y cantidades relativas para los métodos de extracción tradicionales: arrastre con vapor (AV) e hidrodestilación (HD), junto con el control *O. vulgare* (O.V). En la Tabla 4-3 se registran los componentes aislados e identificados por CG-EM en las diferentes extracciones por EFS. En cada una de dichas tablas se relaciona el porcentaje de cada tipo de compuestos contenidos en cada uno de los respectivos extractos.

Tabla 4-2: Cantidad relativa (%) e identificación de los principales componentes (>0,01%) de aceites esenciales de *L. origanoides* Kunth del Alto Patia obtenidos por los AV y HD, y el control *Oreganum vulgare* sp *hirtum*.

No. Pico	Identificación tentativa	Tipo	I_K		Cantidad relativa, (%)		
			DB-5MS	DB-Wax	O.V	AV	HD
1	α-Pineno	M	934	1027	< 0,1	-	-
2	Canfeno	M	953	1077	< 0,1	-	-
3	β-Mirceno	M	990	1050	0,1	0,6	1,2
4	α-Terpineno	M	1021	1064	0,1	0,3	0,5
5	ρ-Cimeno	M	1029	1151	2,7	5,6	9,2
6	Limoneno	M	1033	1082	0,1	0,1	0,3
7	β-Felandreno	M	1036	1090	0,1	0,1	0,1
8	1,8-Cineol o Eucaliptol	MO	1038	1093	< 0,1	0,1	0,1
9	γ-Terpineno	M	1062	1128	1	0,5	0,8
10	Linalool	MO	1100	1421	0,3	0,3	0,4
11	Borneol	MO	1165	1645	0,1	-	-
12	Umbellulona	MO	1177	1523	-	0,4	0,4
13	Terpinen-4-ol	MO	1188	---	0,2	1	1,2
14	ρ-Cimen-8-ol	MO	1192	1728	-	0,3	0,3
15	α-Terpineol	MO	1201	1578	-	0,1	0,2
16	Timol metiléter	FP	1231	1470	-	1,4	1,8
17	Carvacrol metiléter	FP	1241	---	0,2	-	-
18	Timol	FP	1293	2063	3,5	64,3	60,8
19	Carvacrol	FP	1300	2090	90,3	0,9	1,1
20	Acetato de Timilo	FP	1349	1732	-	4,3	5,4
21	trans-β-Cariofileno	S	1435	1484	0,7	5,3	4,1
22	cis-α-Bergamoteno	S	1441	---	-	0,2	0,2
23	Compuesto oxigenado , N.I. (M*166)		1444	---	-	1,4	0,4
24	Aromadendreno	S	1453	1495	-	0,3	0,1
25	α-Humuleno	S	1471	1558	-	3,7	2,8
26	Compuesto oxigenado , N.I. (M*180)		1479	2329	-	1,5	1,3
27	Viridifloreno	SO	1503	1584	-	0,3	0,2
28	β-Bisaboleno	S	1514	1613	0,4	1,2	0,9
29	γ-Amorfeno	S	1528	---	-	0,3	0,2
30	N.I. (M*222)		1541	---	-	0,2	0,3
31	Espatulenol	SO	1592	2017	-	0,2	0,2
32	Oxido de cariofileno	SO	1600	1879	0,2	3,2	3,6
33	Epóxido II humuleno	SO	1629	1936	-	1,5	1,7
34	N.I.		1900	---	-	0,5	0,3
Familia de compuestos					**Cantidad relativa (%)**		
Hidrocarburos monoterpénicos (M)					4,1	7,2	12,1
Monoterpenos oxigenados (MO)					0,6	2,2	2,6
Fenilpropanoides (FP)					94	70,9	69,1
Hidrocarburos sesquiterpénicos (S)					1,1	11	8,3
Sesquiterpenos oxigenados (SO)					0,2	8,1	7,4
N.I: No identificado					_	0,7	0,6

Tabla 4-3: Cantidad relativa (%) e identificación de los principales componentes (>0,01%) de aceites esenciales de *L. origanoides* Kunth del Alto Patia obtenidos por EFS a diferentes temperaturas de extracción.

No. Pico	Identificación tentativa	Tipo[a]	I_k		Cantidad relativa, (%)		
			DB-5MS	DB-Wax	EFS 110 bar 40°C	EFS 110 bar 50°C	EFS 110 bar 60°C
1	ρ-Cimeno	M	1029	1151	-	0,7	-
2	Timol metiléter	FP	1231	1470	-	0,5	-
3	Timol	FP	1293	2063	99,9	83,2	99,9
4	Acetato de Timilo	FP	1349	1732	D	2,3	D
5	trans-β-Cariofileno	S	1435	1484	D	4,8	D
6	cis-α-Bergamoteno	S	1441	---	-	3,1	-
7	α-Humuleno	S	1471	1558	D	-	D
8	Compuesto oxigenado , N.I. (M*180)	SO	1479	2329	-	0,9	-
9	β-Bisaboleno	S	1514	1613	-	1	-
10	Oxido de cariofileno	SO	1600	1879	D	1,6	D
11	Epóxido II humuleno	SO	1629	1936	D	0,9	D
12	N.I.		1900	---	D	1,1	D
Familia de compuestos					**Cantidad relativa (%)**		
Hidrocarburos monoterpénicos (M)					-	0,7	-
Monoterpenos oxigenados (MO)					-	-	-
Fenilpropanoides (FP)					99,9	86	99,9
Hidrocarburos sesquiterpénicos (S)					D	8,9	D
Sesquiterpenos oxigenados (SO)					D	3,4	D
N.I: No identificado					D	1,1	D

D: Detectado < 0,1%. - -: No detectado.

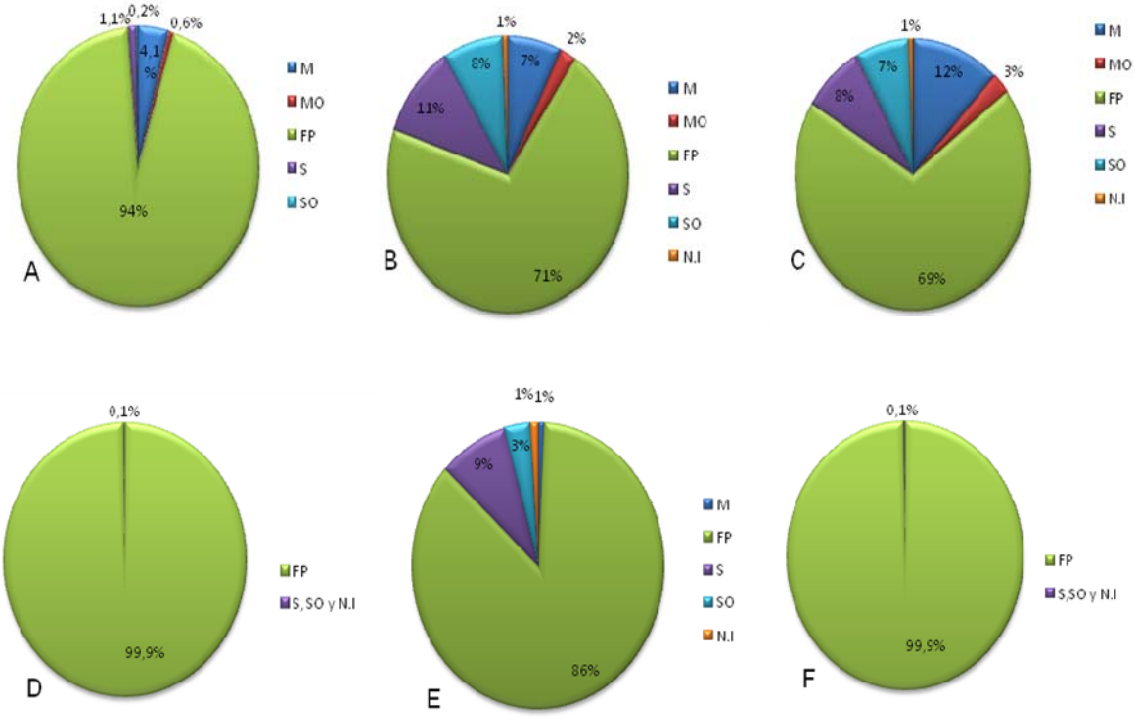
En la Figura 4-1 se observan la variación de las cantidades relativas (%) por familias de compuestos encontrados en los extractos obtenidos por los diferentes métodos de extracción. En el extracto de *L. origanoides* Kunth obtenido por AV se identificaron principalmente tres grupos de compuestos, a saber, *fenilpropanoides*, constituidos por timol, acetato de timilo, timol metil éter y carvacrol, *hidrocarburos sesquiterpénicos*, entre los cuales se destacan trans-β-cariofileno y α-humuleno, finalmente la familia de compuestos *sesquiterpenos oxigenados*, siendo su representante más abundante el óxido de cariofileno, seguido por el epóxido II humuleno.

En el extracto obtenido por HD se identificaron principalmente tres grupos de compuestos, *fenilpropanoides*, constituidos por timol, acetato de timilo, timol metil éter y carvacrol, *hidrocarburos monoterpénicos*, entre los que se destacan ρ-cimeno, β-mirceno y γ-terpineno, *hidrocarburos sesquiterpénicos*, constituido principalmente por trans-β-cariofileno y α-humuleno.

Por otro lado, el *O. vulgare* está constituido principalmente por los grupos de compuestos *fenilpropanoides* tales como el carvacrol, timol y carvacrol metil éter, *hidrocarburos*

monoterpénicos siendo su representante más abundante el ρ-cimeno, finalmente los *hidrocarburos sesquiterpénicos*, constituido por el trans-β-cariofileno y β-bisaboleno.

Figura 4-1: Familia de compuestos en los diferentes extractos: A) *Oreganum vulgare*, B) *L. origanoides* obtenido por arrastre con vapor, C) *L. origanoides*-hidrodestilación, D) EFS 40 °C-110 bar, E) EFS 50 °C-110 bar, F) EFS 60 °C-110 bar.



En los extractos obtenidos por EFS a las temperaturas de 40°C y 60°C se identificaron principalmente tres grupos de compuestos, a saber, *fenilpropanoides*, constituidos por timol y acetato de timilo, *hidrocarburos sesquiterpénicos*, siendo detectados los compuestos trans-β-cariofileno y α-humuleno y finalmente la familia de compuestos *sesquiterpenos oxigenados*, con los compuestos óxido de cariofileno y epóxido II humuleno. El extracto obtenido a 50°C está constituido principalmente por tres grupos de compuestos, *fenilpropanoides*, constituidos por timol, acetato de timilo y timol metil éter, *hidrocarburos sesquiterpénicos*, entre los cuales se destacan trans-β-cariofileno y cis-α-

bergamoteno, finalmente los *sesquiterpenos oxigenados*, siendo su representante más abundante el óxido de cariofileno, seguido por el epóxido II humuleno.

Tal como se observa en la Tabla 4-2, Tabla 4-3 y Figura 4-1, la familia de compuestos predominante en todos los extractos obtenidos de *L. origanoides*, es la de los compuestos tipo fenilpropanoides, siendo el compuesto mayoritario el timol.

En el extracto obtenido por AV se obtuvo una menor cantidad de hidrocarburos monoterpénicos (M) en contraste con el extracto de HD; debido posiblemente a una baja eficiencia de extracción, otro factor que pudo llegar a jugar un papel importante durante la extracción mediante esta técnica, es el contenido de compuestos grasos (lípidos) en la planta; ya que son poco volátiles y en cierto modo, llegarían a retener la fracción de hidrocarburos volátiles, los cuales muestran más afinidad por los compuestos grasos y por ello su baja proporción (Galleti y Bonaga, 1988; Güenther, 1948). En los extractos EFS hay una gran cantidad de compuestos fenilpropanoides (FP), probablemente debido a la disminución de efectos térmicos e hidrolíticos; sin embargo, podrían haber pérdidas de compuestos monoterpénicos en el momento de la despresurización (Lucchesi, et al., 2004). Adicionalmente, se evidencia que cada método de extracción presenta una especial afinidad por determinadas familias de compuestos, tal como lo expresan Mendivelso y Olivares (2007) en su trabajo sobre geranio.

En los extractos obtenidos de *L. origanoides* Kunth por arrastre con vapor e hidrodestilación se detectaron 30 compuestos en cantidades > 0,1%, de los cuales, no fueron identificados 4 compuestos, tal como se observa en la Tabla 4-2. Por el método de AV se obtuvieron extractos donde el 64,3% corresponde al timol, seguido por ρ-cimeno (6%), trans-β-cariofileno (5,3%), acetato de timilo (4,3%), α-humuleno (3,7%), óxido de cariofileno (3,2%), epóxido II humuleno (1,5%) y timol metil éter (1,4%). Para HD el timol correspondió al 60,8%, seguido por ρ-cimeno (9,2%), acetato de timilo (5,4%), trans-β-cariofileno (4,1%), óxido de cariofileno (3,6%), α-humuleno (2,8%), timol metil éter (1,8%) y epóxido II humuleno (1,7%).

Se destaca que la composición de *L. origanoides* es notoriamente diferente respecto a la composición de *O. vulgare*, en éste último predomina el carvacrol (90,3%), seguido del timol (3,5%), ρ-cimeno (2,7%) y el γ-terpineno (1%), como se observa en la Tabla 4-2.

Para el caso del método EFS, en los extractos de EFS 40 °C-110 bar y EFS 60 °C-110 bar se detectaron 7 compuestos, de los cuales 1 no fue identificado. En el extracto de EFS 50 °C-110 bar se detectaron 11 compuestos, de los cuales 2 no fueron identificados. El método EFS fue muy selectivo a las temperaturas de 40 °C y 60 °C extrayendo menor número de componentes, razón por la cual aumentó el porcentaje relativo de timol (99,99%), el 0,01% restante correspondió a los compuestos acetato de timilo, trans β-cariofileno, α-humuleno, óxido de cariofileno, epóxido II humuleno y un compuesto N.I. En EFS a 50 °C se obtuvo principalmente timol con un 83,2%, seguido por trans-β-

cariofileno (4,8%), cis-α-bergamoteno (3,1%), acetato de timilo (2,3%), óxido de cariofileno (1,6%), epóxido II humuleno (0,9%) y ρ-cimeno (0,7%), ver Tabla 4-3.

Lo que se infiere de lo anterior es que la temperatura en fluidos supercríticos juega un papel importante, y en efecto parece ser un factor significativo para la solubilidad de los compuestos. Las temperaturas de 40 °C y 60 °C podrían llegar a ser utilizadas en la obtención de timol con altos rendimientos.

Comparando entre los diferentes métodos de extracción, en cuanto a la cantidad relativa de timol, los mayores valores se obtuvieron por EFS, especialmente a 40 y 60 °C, contrario a lo observado en los aceites esenciales obtenidos por AV y HD; lo cual podría deberse a una alteración (Luque de Castro et al., 1999; Pollien et al., 1998; Diaz et al., 2002; Jimenez et al., 1999; Lucchesi, et al., 2004). Estos resultados entre los diferentes métodos de extracción están de acuerdo a lo reportado por Ruiz et al. donde en muestras de *Lippia origanoides* provenientes de la cuenca del cañón del río Chicamocha y sembradas en el complejo industrial de CENIVAM, encontraron también una mayor cantidad de timol en el aceite extraído por EFS en comparación con HD (77,7% y 56,3%, respectivamente) (2007). Por otro lado, existen otros estudios donde utilizan los métodos de HD convencional e hidrodestilación asistida por microondas, reportando que la cantidad de compuestos fenilpropanoides es mayor en este último método de obtención (Golmakani y Rezaei, 2008; Bousbia et al., 2009).

En cuanto a la cantidad relativa de los compuestos, en la muestra en estudio se encontraron mayores contenidos de timol, que en estudios anteriores de *L. origanoides*; Morais et al. reportaron en esta misma especie un porcentaje del 20,6% de timol y un 64,8% de timol en la especie *Conobea scoparioides* (1972), mientras que Terblanché y Kornelius (1996) y Gallino (1987) reportaron un 38,4% de timol, en muestras provenientes del Brazil, siendo diferente su composición a *L. citriodora*. No obstante otros autores reportaron, que mediante HD en muestras de 3 diferentes orígenes del Brazil se encontró otro quimiotipo, el cual es rico en carvacrol (33,5% - 42,9%), seguido por timol (5,1% - 8,4%) y ρ-cimeno entre 11,9% - 15,8% (Dos Santos et al., 2004), al igual que Oliveira et al. quienes reportaron que el carvacrol también fue el principal constituyente (38,6%), seguido por timol (18,5%) y ρ-cimeno (10%) (2007). En contraste con estos estudios, en quimiotipos de especies de *Lippia* provenientes de Argentina, los compuestos mayoritarios fueron acetato de timilo (17%), γ-terpineno (4,27%) y ρ-cimeno (3,23%) (Velasco y Perez, 1993).

Mientras que en los quimiotipos de Colombia y Venezuela (Rojas et al., 2006), el compuesto mayoritario fue timol en promedio de 56%, siendo más bajo en cantidad relativa al encontrado en esta investigación. En el estudio realizado por Stashenko et al. y Escobar et al. quienes en aceites esenciales de *L. origanoides* de diferentes regiones de Colombia, obtenidos de hojas, flores y tallos mediante hidrodestilación asistida por microondas, encontraron que en Bucaramanga, Jordán y Piedecuesta existe un quimiotipo rico en carvacrol denominado B, con cantidades relativas de 38.49%, 36.48% y 46.33%, respectivamente; mientras que en Cauca, Nariño y Boyacá el quimiotipo es

rico en timol denominado C, con valores de 53.55%, 55.19% y 57.18%, respectivamente. Adicionalmente encontraron que en la misma zona de Bucaramanga y Jordan junto con Los Santos en Santander existe también otro quimiotipo denominado A, distinguido por los compuestos α y β felandreno, ρ-cimeno y limoneno (2010).

En cuanto a lo reportado por Stashenko et al., respecto al AEO obtenido por EFS, vale la pena resaltar que dicho trabajo no presenta rendimientos, ni composición del AEO obtenido por EFS, empleando 10 g de material vegetal, 200 g de CO_2 y 120 min de extracción. En contraste, el presente trabajo de investigación determinó el rendimiento y la composición del AEO obtenido por EFS, metodología que requirió 5 g de material vegetal con 100 g de CO_2 y 90 min de extracción (2010).

Con todo lo anterior, se puede concluir que independiente del método de extracción, el timol es el compuesto mayoritario en los AE de *L. origanoides* obtenidos; por otro lado con el método de EFS se obtiene una alta selectividad en la extracción de compuestos. Es de anotar que varios estudios han demostrado que la funcionalidad y la pureza de los productos obtenidos por medio de esta extracción son de mejor calidad y tienen un gran poder antioxidante (Esquivel y Vargas, 2007). Dicho extracto podría llegar a ser útil para la empresa Bayer, en la elaboración de su producto *Exomite Apis* (polvo), un innovador producto para el control de *Varroa* en apicultura de forma ecológica y orgánica, ó en el producto *Apiguard* (gel), debido a que su principio activo es el timol.

4.3. Actividad antioxidante y contenido total de fenoles

La capacidad antioxidante total de los extractos de *L. origanoides* para cada uno de los métodos de extracción fueron medidos por los métodos DPPH, FRAP, ORAC y por la decoloración del β-caroteno. En los métodos de DPPH, ORAC y blanqueamiento del β-caroteno la medida de actividad antioxidante se basa en la cinética de descomposición del compuesto cromóforo, mientras que en el método FRAP la medida de actividad antioxidante está basada en la cinética de formación del cromóforo. De esta manera, una mayor decoloración en los métodos DPPH y ORAC y una mayor aparición del compuesto cromóforo en el método FRAP, implica que el extracto obtenido de *L. origanoides* presenta una mayor actividad antioxidante hidrofílica, mientras que en el método lipofílico del blanqueamiento del β-caroteno, una menor decoloración del β-caroteno implica que el extracto presenta una mayor actividad antioxidante y por consiguiente, una mayor capacidad de evitar la oxidación.

Un aspecto a considerar en la determinación de capacidad antioxidante *in vitro* es que, debido a las múltiples modificaciones hechas en cada uno de los métodos existentes, muchas veces la comparación entre resultados, aun correspondiendo al mismo método de medida, se deben efectuar con precaución; ya que pueden haber existido cambios en la temperatura del ensayo, sus condiciones de procesado, en el modo de combinar las muestras con los reactivos (tiempo de exposición de los compuestos activos a los reactivos) y en la metodología empleada en la extracción (tamaño de partícula, ciclos de

extracción, modo de agitación de la muestra, relación muestra: solvente, etc.) (Bompadre et al., 2004; Mukhopadhyay et al., 2006). Así mismo, el hecho de que en el sistema a analizar haya una alta o una baja actividad de agua trae como consecuencia la migración de compuestos, produciendo fenómenos de cristalización, coalescencia, complejación, colapsos de estructuras, etc (Mukhopadhyay et al., 2006). Además, se debe tener en cuenta el hecho de que, en la literatura, los resultados para un mismo método se expresan de múltiples formas, lo que dificulta su comparación (Villaño et al., 2005; Grabmann, 2005).

En el caso de fenoles totales se debe señalar que, a pesar de lo extendido que se encuentra esta metodología, muy pocos artículos siguen exactamente el protocolo original, además, muchos, en vez de expresar los resultados en equivalentes de ácido gálico, lo hacen en catequina, ácido clorogénico, cafeico o ferúlico, lo que dificulta la comparación de los resultados (Prior et al., 2005).

4.3.1. Ensayo actividad antiradicalaria DPPH

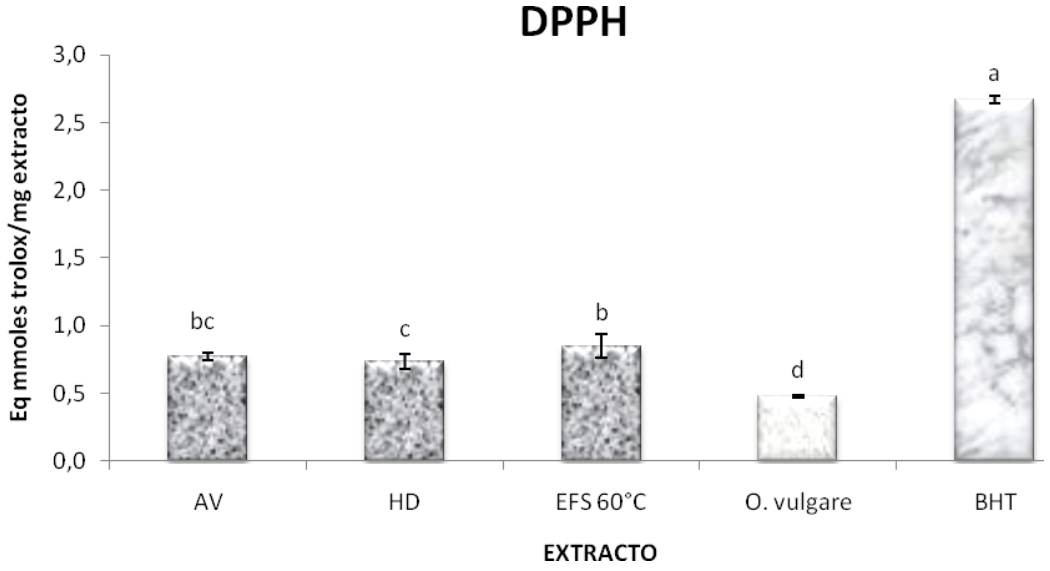
EL DPPH se utiliza como reactivo para determinar el poder antioxidante de una sustancia por captura de radicales libres. Es decir, mide la capacidad de los antioxidantes de neutralizar y evitar la propagación en cadena de los radicales libres (Thaipong, et al., 2006). En este estudio el método AV presentó una actividad de 0,769 equivalentes de mmoles trolox/mg extracto, mientras que HD una actividad de 0,735 equivalentes de mmoles trolox/mg extracto. Para el método EFS a las diferentes temperaturas (40°C, 50 °C y 60 °C) con este método antiradicalario se encontraron valores de 0,946, 0,865 y 0,847 equivalentes de mmoles trolox/mg extracto respectivamente, siendo estadísticamente iguales con un $p<0,05$.

Comparando los diferentes métodos de extracción por su actividad antiradicalaria como se ilustra en la Figura 4-2 se observó que el extracto AV es similar a HD y a EFS, siendo HD diferente a EFS; sin embargo, el que ocasionó la mayor reducción (decoloración) del cromóforo fue el antioxidante sintético BHT (2,671 equivalentes de mmoles trolox/mg sustancia).

Un baja actividad en el proceso por HD podría ser debido a una degradación térmica, una hidrólisis y solubilidad en agua de algunos compuestos que alteran no solo el perfil de sabor y la fragancia de muchos aceites esenciales extraídos por esta técnica, haciendo que su actividad disminuya (Reverchon y De Marco, 2006).

La actividad en el extracto obtenido por EFS podría estar asociado a los compuestos pertenecientes al grupo fenilpropanoides, hidrocarburos sesquiterpénicos y sesquiterpenos oxigenados principalmente y esto podría deberse a su habilidad de donar átomos de hidrogeno o electrones al electrón impar del DPPH.

Figura 4-2: Actividad antioxidante medida por el método antiradicalario DPPH de los extractos obtenidos de *Lippia origanoides* Kunth y los controles *Oreganum vulgare* spp *hirtum* y BHT. [a,b,c,d] Medias con letras diferentes indican diferencias significativas (P<0,05).



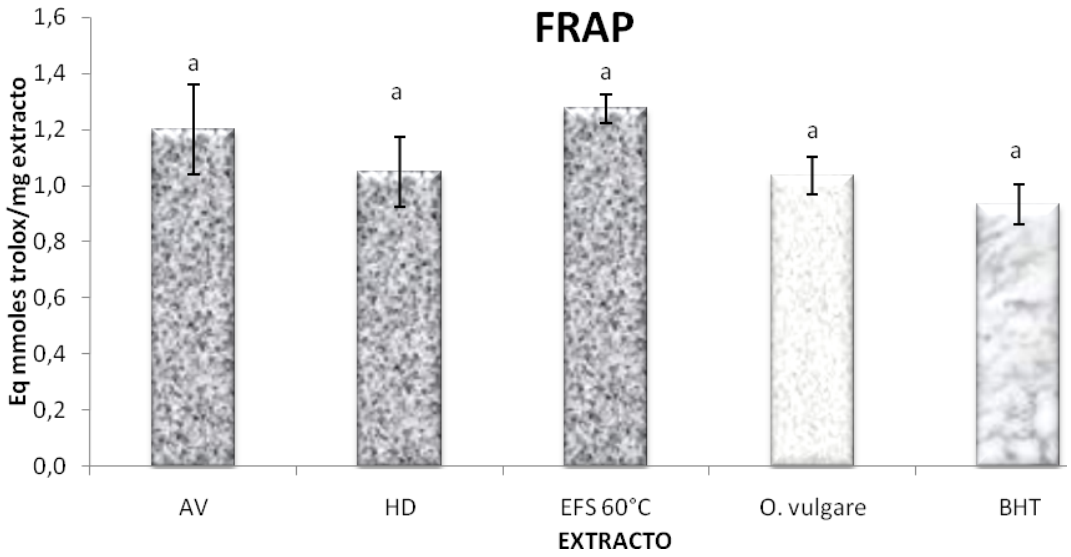
Esto sugiere que los extractos EFS por contener mayor cantidad relativa de compuestos activos (fenilpropanos), las moléculas antioxidantes pueden enlazarse al radical libre DPPH; entre más rápidamente disminuya la absorbancia, más potente es la actividad antioxidante del extracto, en términos de capacidad de donación de átomos de hidrógeno. El bajo contenido mostrado por el aceite de *O. vulgare* puede ser explicado por su poca solubilidad, de acuerdo a lo reportado por Moller et al. (1999), los constituyentes del orégano tal como lo es el carvacrol muestra solubilidad parcial en sistemas acuosos. Es importante resaltar que en otros estudios realizados por Oliveira et al. (2007) y Yanishlieva et al. (1999), enfocados en timol y carvacrol, encontraron que el impedimento estérico del grupo hidroxilo por parte del isopropilo juega un rol importante en esta actividad, siendo el timol más efectivo que el carvacrol. Los extractos de *Lippia origanoides* del Alto Patía evaluados por DPPH presentaron menor capacidad antioxidante que el antioxidante sintético BHT. Es de anotar que la actividad antioxidante de estos aceites esenciales, específicamente para esta especie *L. origanoides* del Alto Patía de procedencia silvestre, determinada por estos métodos de actividad antioxidante "*in vitro*", se reporta por primera vez.

4.3.2. Evaluación del poder de reducción FRAP

El método FRAP es capaz de medir la capacidad de reducción de un antioxidante. FRAP actúa sobre los polifenoles capaces de donar electrones reduciendo intermediarios oxidados.

El extracto obtenido por AV presentó una capacidad reductora del complejo $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2*}$ de 1,202 equivalentes de mmoles trolox/mg extracto, en el extracto de HD se obtuvo un poder reductor de 1,050 equivalentes de mmoles trolox/mg extracto. En los extractos obtenidos por EFS el de mayor capacidad reductora fue el EFS110 bar-60 °C (1,275 equivalentes de mmoles trolox/mg extracto) seguido por el EFS110 bar-40 °C (0,901 equivalentes de mmoles trolox/mg extracto) y tuvo muy poca capacidad de reducción el EFS110 bar-50 °C (0,698 equivalentes de mmoles trolox/mg extracto).

Figura 4-3: Actividad antioxidante medida por método del poder de reducción FRAP de los extractos obtenidos de *Lippia origanoides* Kunth y los controles *Oreganum vulgare* spp *hirtum* y BHT. [a,b] Medias con letras diferentes indican diferencias significativas (P<0,05).



En la comparación del método FRAP por los diferentes métodos de extracción que se ilustra en la Figura 4-3, se puede decir que los extractos de *L. origanoides* Kunth del Alto Patía presentan un poder reductor igual al *O. vulgare* (1,036 equivalentes de mmoles trolox/mg extracto) y al antioxidante sintético BHT (0,934 equivalentes de mmoles trolox/mg sustancia) al donar electrones al Fe^{3+} para convertirlo en Fe^{2+}, con un p<0,05. Es decir, el aceite esencial de *L. origanoides* sería una buena alternativa de sustitución a este antioxidante sintético, debido a su efecto cancerígeno a largo plazo (Pokorny et al., 2001; Valenzuela y Nieto, 1996; Thompson et al., 1988).

Es importante mencionar que los extractos EFS y AV están conformados por tres grupos de compuestos principalmente, fenilpropanoides, hidrocarburos sesquiterpénicos y sesquiterpénicos oxigenados y podrían ser las sustancias reductoras que potencialmente reducirían el complejo ferricianuro a la forma ferrosa. Diferentes estudios han indicado que la capacidad de donación de electrones, lo que refleja el poder reductor de los

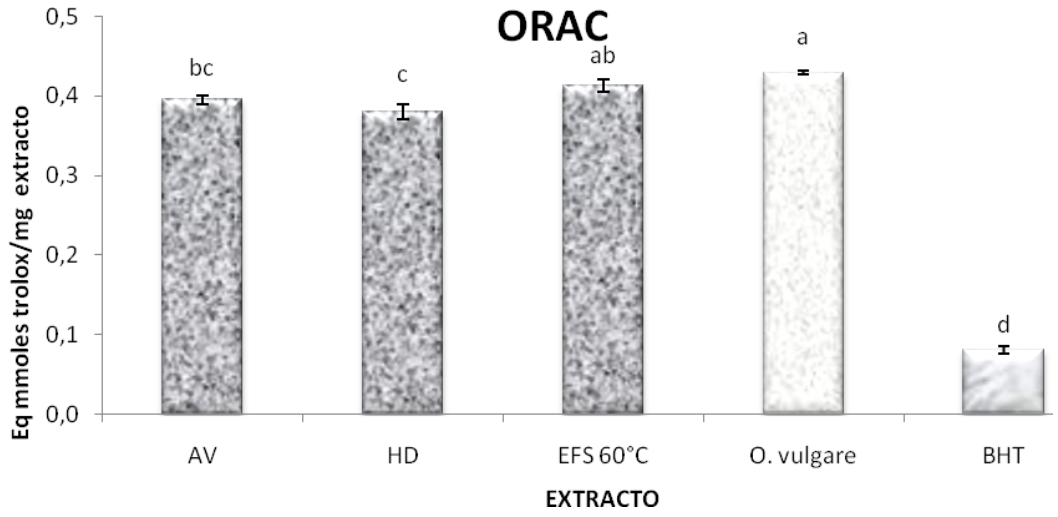
compuestos bioactivos, se asocia con actividad antioxidante (Siddhuraju et al., 2002; Arabshahi y Urooj, 2007).

Uno de los estudios que reportan la evaluación del poder reductor de especies de *Lippia,* aunque los datos no son comparables con los obtenidos en este trabajo debido a las diferencias en la metodología empleada, obtuvieron un valor de 0,688 mmoles Fe/100 g como medida de su poder reductor (Araya et al., 2006).

4.3.3. Ensayo de la capacidad de absorbancia del radical oxígeno ORAC

La actividad frente a los radicales peroxilo del extracto AV fue de 0,395 equivalentes de mmoles trolox/mg extracto y el extracto de HD presentó una capacidad de evitar la decoloración de 0,379 equivalentes de mmoles trolox/mg extracto. En los extractos obtenidos por EFS, se obtuvo actividades para EFS 110 bar – 40 °C, 50 °C y 60 °C de 0.419, 0.406 y 0.413 equivalentes de mmoles trolox/mg extracto, respectivamente; los cuales fueron estadísticamente iguales con un P<0,05.

Figura 4-4: Actividad antioxidante medida por método de la capacidad de absorbancia del radical oxígeno ORAC de los extractos obtenidos de *Lippia origanoides* Kunth y los controles *Oreganum vulgare* spp *hirtum* y BHT. [a,b,c,d] Medias con letras diferentes indican diferencias significativas (P<0,05).



Los resultados obtenidos de los diferentes métodos de extracción por el método de absorbancia del radical oxígeno ORAC se ilustran en la Figura 4-4. Se observa que el

extracto de *Lippia origanoides* Kunth por EFS tuvo la mayor capacidad de inhibir la decoloración de la fluoresceina, siguiendo en orden descendente AV y por último el extracto obtenido por HD. Así mismo el extracto EFS es estadísticamente igual al extracto de *O.vulgare* (0,429 equivalentes de mmoles trolox/mg extracto) con un P<005 y el BHT (0,080 equivalentes de mmoles trolox/mg sustancia) presentó la menor actividad frente a los radicales peroxilo, por consiguiente una menor capacidad de evitar la decoloración.

4.3.4. Ensayo blanqueamiento β-caroteno

El extracto AV tuvo una capacidad de inhibir la decoloración del β-caroteno de 2,96 equivalentes de mmoles α-tocoferol/mg extracto mientras que la actividad del extracto por HD fue de 3,191 equivalentes de mmoles α-tocoferol/mg extracto. Dentro de los extractos obtenidos por EFS, los extractos que tuvieron la mayor capacidad de inhibir la decolación fueron EFS 110 bar-40 °C y 60 °C (9.787 y 8,574 equivalentes de mmoles α-tocoferol/mg extracto) siendo estadísticamente iguales con un P<0,05; por otro lado el EFS 110 bar-50 °C tuvo una menor capacidad de evitar la oxidación (6,645 equivalentes de mmoles α-tocoferol/mg extracto).

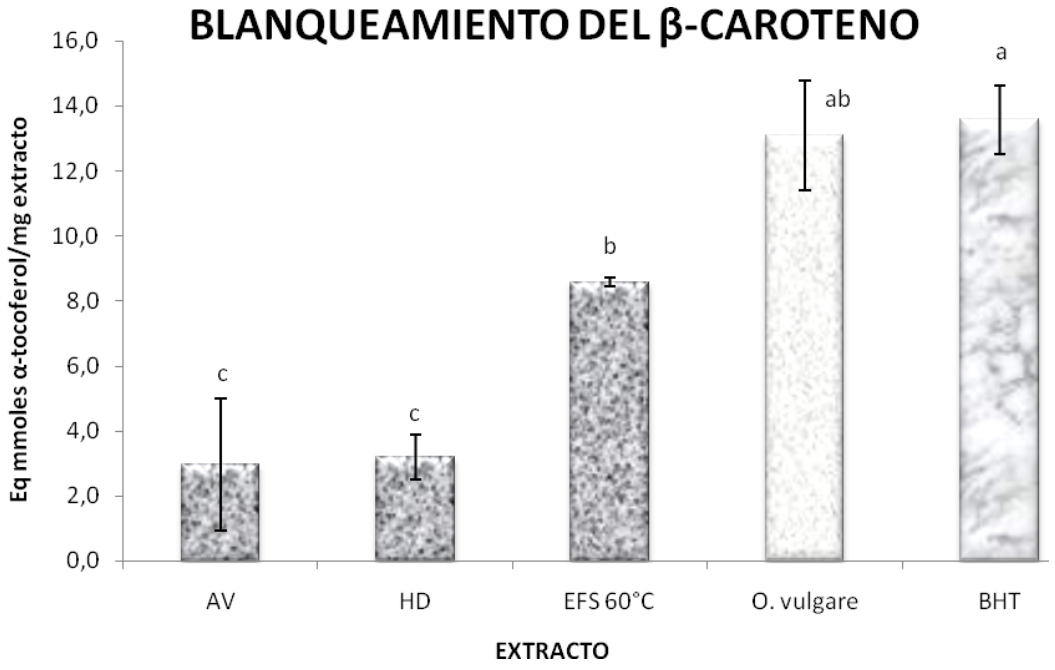
Comparando los diferentes métodos de extracción por el método lipofílico del blanqueamiento del β-caroteno (BET) que se ilustra en la Figura 4-5 se observó que el extracto de *Lippia origanoides* Kunth obtenido por EFS tuvo la mayor capacidad de inhibir la decoloración del β-caroteno, seguido por los métodos tradicionales AV y HD quienes son estadísticamente iguales a un P<0,05. En comparación con los controles, el extracto obtenido por EFS presenta una actividad similar a el *O.vulgare* (13.096 equivalentes de mmoles α-tocoferol/mg extracto), pero menor al antioxidante sintético BHT (13.583 equivalentes de mmoles α-tocoferol/mg sustancia) quien presentó la mayor actividad, por consiguiente una mayor capacidad de evitar la oxidación.

Al comparar las técnicas tradicionales AV y HD, se observó que estos no presentaron una actividad significativa, esto debido a que algunos antioxidantes polares del proceso de extracción se pudieron haber quedado en la fase acuosa de la emulsión siendo más diluidos en la fase lipídica y por tanto son menos eficientes en la protección del ácido linoleico, a pesar de contener los mismos compuestos polares (Koleva et al., 2002).

La EFS es más eficiente en la obtención de antioxidantes capaces de inhibir la degradación del β-caroteno; lo cual hace que esta técnica sea adecuada para la obtención de fracciones fenólicas con capacidad antioxidante. Estos primeros resultados sugieren que el extracto obtenido por el método EFS a 60 °C contiene la mayor concentración de compuestos con actividad antioxidante, o bien, que contiene compuestos con una alta actividad antioxidante y que en el extracto AV los compuestos extraídos tienen poca actividad antioxidante o que éstos se encuentran en poca concentración.

En este trabajo también se encontró el alto poder antioxidante del BHT, similar a lo encontrado por Kulisic et al. donde se disminuye en orden BHT > O. vulgare > *Lippia origanoides*, es decir el BHT es más fuerte aunque los aceites esenciales de *L. origanoides* mostraron un efecto antioxidante importante (2004).

Figura 4-5: Actividad antioxidante medida por método del blanqueamiento del β-caroteno de los extractos obtenidos de *Lippia origanoides* Kunth y los controles *Oreganum vulgare* spp *hirtum* y BHT. [a,b,c] Medias con letras diferentes indican diferencias significativas (P<0,05).



Los valores tan altos en Eq mmoles reportados en este estudio podrían sugerir que la actividad antioxidante de los extractos de *Lippia origanoides* son principalmente de carácter lipofílico, además de ser la donación de átomos de hidrógeno el principal mecanismo de actividad antioxidante de los compuestos de la *L. origanoides*.

4.3.5. CONTENIDO TOTAL DE FENOLES

Los compuestos fenólicos de las plantas constituyen uno de los principales grupos de compuestos que actúan como antioxidantes primarios o radicales libres terminadores, razón por la cual es necesario cuantificarlos en los extractos de plantas (Prakash et al., 2009), adicionalmente este análisis se realizó como una metodología de comparación con otros datos de literatura.

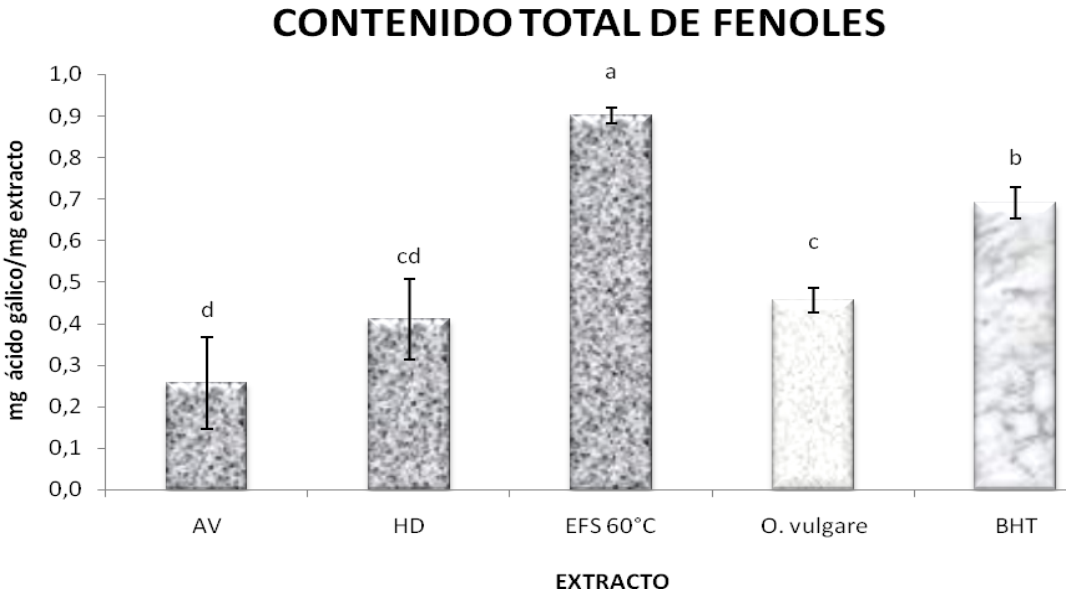
El contenido total de fenoles del extracto obtenido por AV y HD fueron de 0,257 y 0,410 mg ácido gálico/mg extracto, respectivamente.

Por el método EFS, los extractos 110 bar - 40 °C y 110 bar - 50 °C presentaron un CTF estadísticamente iguales (0,821 y 0,855 mg ácido gálico/mg extracto) con un P<0,05, y significativamente diferentes a el extracto 110 bar - 60 °C (0,901 mg ácido gálico/mg extracto).

Los diferentes métodos de extracción se presentan en la Figura 4-6 donde el extracto obtenido por EFS presentó el mayor CTF seguido por el método de extracción HD y el de menor contenido fue el método de extracción AV. Así mismo el extracto obtenido por EFS presentó un mayor CTF que el antioxidante sintético BHT (0,69 mg ácido gálico/mg sustancia) y quien presentó el menor contenido fue el *O.* vulgare *(*0,456 mg ácido gálico/mg extracto). Este resultado podría sugerir que el extracto obtenido por EFS podría ser empleado como antioxidante en diferentes campos, tales como la industria cosmética, alimenticia, farmacéutica, entre otras, sin embargo esta afirmación requiere de una evidencia experimental que la sustente (realizando estudios en sistemas que estén expuestos a degradación oxidativa).

Es necesario aclarar que, todos los ensayos "*in vitro"* sobre capacidad antioxidante de extractos, deben complementarse con ensayos "*in vivo"*, así como con estudios sobre el posible efecto prooxidante de estos compuestos a dosis elevadas (Frankel y Meyer, 2000). Como también habrá que considerar si los compuestos responsables de esta capacidad antioxidante son o no biodisponibles en el tracto gastrointestinal y el grado de retención de ese compuesto en los tejidos (Aruoma, 2003; Wu et al., 2004).

Figura 4-6: Contenido total de fenoles de los extractos obtenidos de *Lippia origanoides* Kunth y los controles *Oreganum vulgare* spp *hirtum* y BHT. [a,b,c,d] Medias con letras diferentes indican diferencias significativas (P<0,05).



En las extracciones obtenidas por EFS la temperatura puede ejercer efecto sobre las interacciones matriz-analito, en casos en los que estas interacciones son débiles un incremento en la temperatura puede favorecer la extracción de los mismos por vaporización (Mukhopadhyay, 2000; Luque de Castro et al., 1993). Este aumento en la cantidad de fenoles extraidos en función de la temperatura ha sido evidenciado en otras investigaciones, Moldao et al., quienes evaluaron el efecto de la temperatura sobre la extracción de fenoles a partir de hojas y tallo de tomillo (*Thymus zygis* L.), encontrando un aumento lineal en la cantidad de fenoles obtenidos en función de la temperatura (30 a 130 °C) a diferentes presiones (8 a 24 MPa), a tal punto que la máxima cantidad de fenoles fue obtenida a 24 MPa y 130 °C (2000). En otro trabajo como el de Ribeiro et al. evaluaron el efecto del aumento de la presión y temperatura sobre la cantidad de fenoles extraídos a partir de las hojas de limon balm (*Melissa officinalis*), observando un aumento en el porcentaje de estos compuestos a medida que se aumentaba la temperatura (entre 35 °C a 50 °C) y a diferentes presiones (10 y 18 MPa) (2001).

Por otro lado, la actividad química de los polifenoles en términos de sus propiedades reductoras, como agentes donadores de hidrógeno o electrones, predicen su potencial de acción en la captura de radicales libres (antioxidantes). Dichos fenoles contienen hidroxilos que son los responsables del efecto de captura de radicales, debido principalmente a sus propiedades redox; regido por su capacidad para estabilizar y deslocalizar los electrones no apareados (Rice et al., 1996,1997).

En resumen, los extractos obtenidos por EFS presentaron los mejores valores de actividad antioxidante por los métodos DPPH y ORAC, siendo cada uno de estos conjuntos de datos estadísticamente iguales. Por el método de decoloración del β-caroteno, los extractos obtenidos por EFS a 40 °C y 60 °C, no presentaron diferencias y fueron los más activos. El extracto obtenido con CO_2 supercrítico a 60 °C presentó la mayor actividad antioxidante por el método FRAP y el mayor CTF. De acuerdo a este estudio, fue seleccionado el extracto EFS 110 bar-60 °C para realizar el siguiente conjunto de experimentos (fraccionamiento y perfil cromatográfico), a pesar de ser el menos diverso en composición, sin embargo se quiso observar el efecto que podrían ejercer los compuestos minoritarios presentes.

4.4. Fraccionamiento y caracterización química

El extracto obtenido por EFS a 110 bar - 60 °C (151 mg) fue sometido a fraccionamiento grueso mediante la técnica de cromatografía de columna flash (CCF), la muestra fue eluída con pentano y éter dietílico, obteniéndose la fracción en pentano (F1) y la fracción en éter (F2) (Tabla 4-4).

Tabla 4-4: Fraccionamiento grueso del extracto de EFS 110 bar-60°C de *Lippia origanoides* del Alto Patía.

SISTEMA ELUCION	FRACCIÓN	PESO(mg)	Rf
			0,342
Pentano			**0,526**
	F1	**32,7**	**0,631**
			0,684
			0,184
Éter dietílico	**F2**	**108,7**	**0,394**
			0,421

El grupo de compuestos presentes en la Fracción 1 (32,7 mg) presentaron Rfs entre 0,342 – 0,684. El grupo de compuestos de la Fracción 2 (108,7 mg) presentaron Rfs entre 0,184 – 0,421. En el caso de la cromatoplaca para la Fracción 2, el timol presentó un Rf de 0,394.

La fracción 1 estaba compuesta por trans-β-cariofileno (65,5%) y α-humuleno (34,5%); por su parte en la fracción 2 se observó que contenía principalmente timol (94,1%), seguido por acetato de timilo (2,6%), óxido de cariofileno (1,2%), epóxido II humuleno (0,7%), y 2 compuestos oxigenados sin identificar (1,3%) ver Tabla 4-5.

A partir del extracto fraccionado (EFS - 60 °C), se logró obtener una fracción rica en trans-β-cariofileno (65,5%) y α-humuleno (34,5%); así como una fracción rica en timol (94,1%). De acuerdo al estudio por CG-EM y a la gravimetría realizada, puede afirmarse que el extracto mencionado anteriormente presenta 0,36%, 0,19% y 1,73% de trans-β-cariofileno, α-humuleno y timol, respectivamente. Respecto a los hidrocarburos sesquiterpénicos señalados anteriormente, Fernandes, et al. determinaron que el tratamiento oral con el trans-β-cariofileno y el α-humuleno, aislados de *Cordia verbenácea*, presentó un efecto inhibitorio en modelos experimentales inflamatorios aplicados en ratones y ratas (2007). Por otra parte, respecto al timol, éste se utiliza como nota odorífera en composiciones de lavanda, en perfumes de hombres, y como materia prima en la producción de mentol racémico (Bauer, et al., 2001; Burdock, 2005). Cabe mencionar también que el timol es el principal ingrediente en fórmulas de enjuagues bucales comerciales, por sus propiedades antisépticas. El aceite esencial de *L. origanoides* podría llegar a reemplazar el uso del tomillo en la medicina herbal para tratar infecciones de la boca y la garganta (Wichtel, 2002). También el timol se utiliza como aditivo de sabor en una serie de alimentos y bebidas (Can y Buchbauer, 2010; Pengelly, 2004). En el año 1992 el timol fue evaluado por el Comité de Expertos en sustancias

saborizantes del Consejo de Europa, y desde entonces se permite su adición a los alimentos hasta un nivel de 50 mg/kg y de 10 mg/kg a las bebidas. El timol está presente en aceites esenciales de cítricos (0,03-0,1%) que se usan ampliamente en la industria de las bebidas refrescantes. Además posee una actividad antioxidante comparable a la de BHA y BHT, antioxidantes de síntesis que se emplean en alimentación y cuyo uso cada vez es más discutido (Dorman et al., 2003). El hecho de que el timol sea un componente natural de la dieta y que se use de forma generalizada como aditivo alimentario, además de que sea rápidamente metabolizado y eliminado cuando es ingerido, hace que los posibles residuos que puedan quedar de un tratamiento veterinario con esta sustancia no sean considerados tóxicos para el hombre. Por ese motivo el timol aparece clasificado en el Anexo II de la regulación europea Nº 2377/90 y no tiene establecido un MRL (límite máximo de residuos) para su presencia en productos derivados de producción ganadera. http://info-bee.com.ar/files/docs/timol%20en%20cria.PDF.

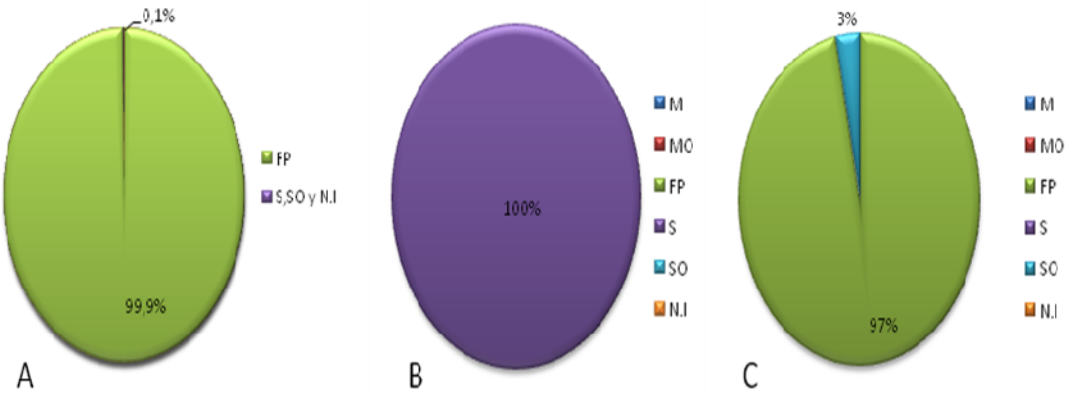
Tabla 4-5: Cantidad relativa (%) e identificación de los principales componentes (>0,01%) de la Fracción 1 y Fracción 2 del aceite esencial de *L. origanoides* Kunth del Alto Patía obtenido mediante EFS 110 bar-60°C.

No. Pico	Identificación tentativa	Tipo	I_K		Cantidad relativa, (%)	
			DB-5MS	DB-WAX	F1[a]	F2[b]
1	Timol	FP	1293	2063	-	94,1
2	Acetato de Timilo	FP	1349	1732	-	2,6
3	trans-β-Cariofileno	S	1435	1484	65,5	-
4	Compuesto oxigenado , N.I. (M^+166)	SO	1444	--	-	0,4
5	α-Humuleno	S	1471	1558	34,5	-
6	Compuesto oxigenado , N.I. (M^+180)	SO	1479	2329	-	0,9
7	Oxido de cariofileno	SO	1600	1879	-	1,2
8	Epóxido II humuleno	SO	1629	1936	-	0,7
Familia de compuestos					Cantidad relativa (%)	
Hidrocarburos monoterpénicos (M)					-	-
Monoterpenos oxigenados (MO)					-	-
Fenilpropanoides (FP)					-	96,7
Hidrocarburos sesquiterpénicos (S)					100	-
Sesquiterpenos oxigenados (SO)					-	3,2

a: Fracción apolar (pentano). b: Fracción polar (éter dietílico)

La figura 4-7 muestra la distribución por grupos de familias de los compuestos del extracto inicial EFS 110 bar – 60 °C de *Lippia origanoides* y de sus fracciones. El 100% de la Fracción 1 son compuestos pertenecientes al grupo de compuestos hidrocarburos sesquiterpénicos, mientras que en la Fracción 2 se identificaron compuestos característicos de dos grupos de compuestos a saber: fenilpropanoides y sesquiterpenos oxigenados.

Figura 4-7: Familia de compuestos del extracto inicial EFS 110 bar – 60 °C de *L. origanoides* (A) y sus fracciones; Fracción 1 (B) y Fracción 2 (C).



4.5. Actividad antioxidante y contenido total de fenoles de las fracciones *Lippia origanoides* Kunth

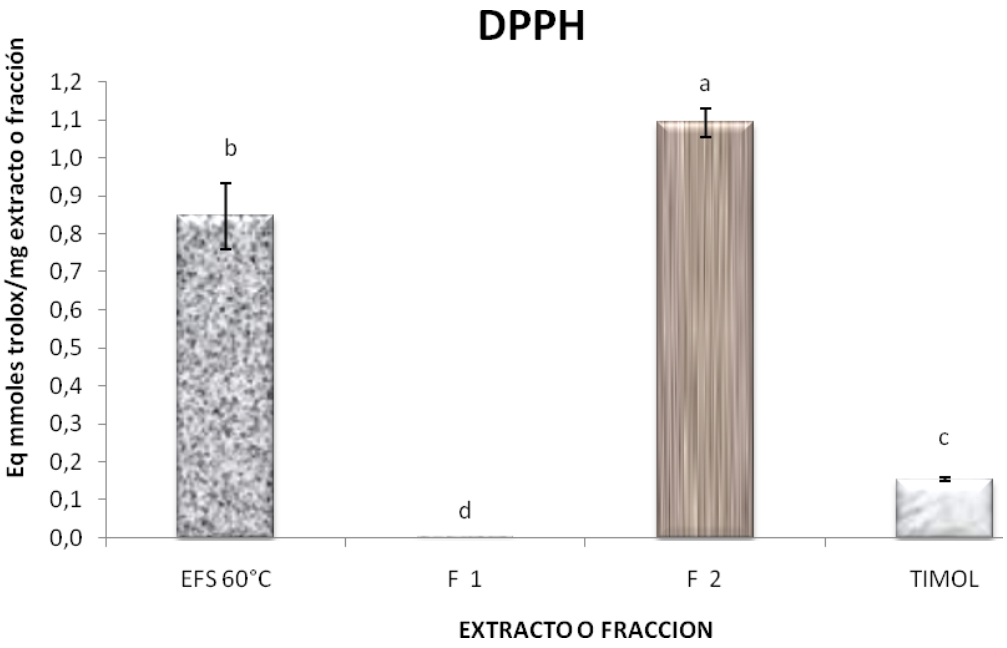
4.5.1. Ensayo actividad antiradicalaria DPPH

La fracción 1 casi no produjo la reacción de reducción (0,002 equivalentes de mmoles trolox/mg extracto) mientras que la Fracción 2 ocasionó la mayor decoloración del cromóforo (1,093 equivalentes de mmoles trolox/mg extracto).

La comparación estadística realizada por Tukey permitió establecer que la fracción 2 presentó una mayor actividad que el extracto inicial (0,847 equivalentes de mmoles trolox/mg extracto), seguido por el estándar de timol (0,155 equivalentes de mmoles trolox/mg sustancia), ver Figura 4-8.

La alta actividad de la fracción 2 podría ser debido al mayor contenido de compuestos sesquiterpenos oxigenados (3,2%), así mismo estos compuestos podrían estar aportando a la actividad de la fracción 2, en comparación con el estándar de timol, ya que presentan mayor capacidad de atrapamiento de radicales libres.

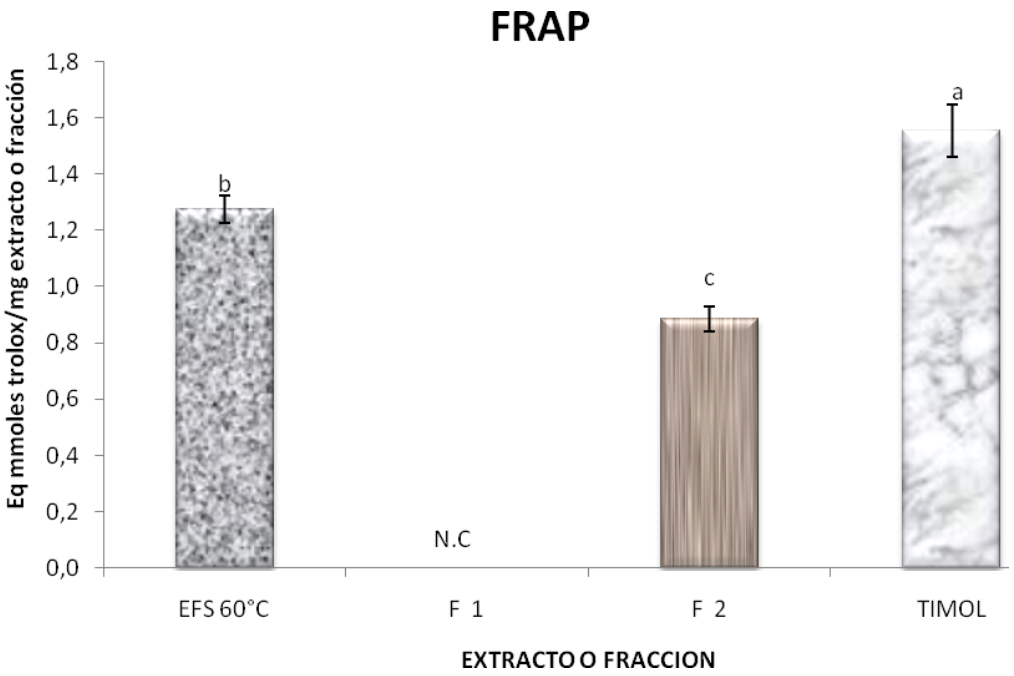
Figura 4-8: Actividad antioxidante medida por método antiradicalario DPPH del extracto obtenido por EFS a 110 bares y 60°C de *Lippia origanoides* Kunth, sus respectivas fracciones y el estándar de timol. [a,b,c,d] Medias con letras diferentes indican diferencias significativas (P<0,05).



4.5.2. Evaluación del poder de reducción FRAP

La fracción 1 no se pudo cuantificar por encontrarse fuera del rango de la curva y la Fracción 2 presentó una capacidad de reducción de 0,885 equivalentes de mmoles trolox/mg extracto), la cual fue inferior a la del extracto original (1,275 equivalentes de mmoles trolox/mg extracto), ver Figura 4-9. Por otro lado el estándar de timol ocasionó la mayor aparición del cromóforo $[Fe(II)(TPTZ)_2]^2$ (1,555 equivalentes de mmoles trolox/mg sustancia).

Figura 4-9: Actividad antioxidante medida por método del poder de reducción FRAP del extracto obtenido por EFS a 110 bares y 60 °C de *Lippia origanoides* Kunth, sus respectivas fracciones y el estándar de timol. [a,b,c] Medias con letras diferentes indican diferencias significativas (P<0,05).



En el extracto total EFS 110 - 60 °C el timol (99,99%) y los compuestos hidrocarburos sesquiterpénicos (trans-β-cariofileno y α-humuleno) podrían estar actuando como sustancias reductoras en el proceso de reducción del complejo ferricianuro a la forma ferrosa. En este caso existiría la posibilidad de presentarse efectos sinérgicos o cooperativos entre los compuestos presentes en el extracto total y que podría contribuir sobre todo en la actividad antioxidante observada como lo menciona Shahidi et al. (1994).

Por otro lado los compuestos del grupo de sesquiterpenos oxigenados óxido de cariofileno y epóxido II humuleno, presentes en la fracción 2, podrían estar actuando posiblemente como compuestos antagónicos puesto que disminuyó su actividad en comparación con el estándar de timol.

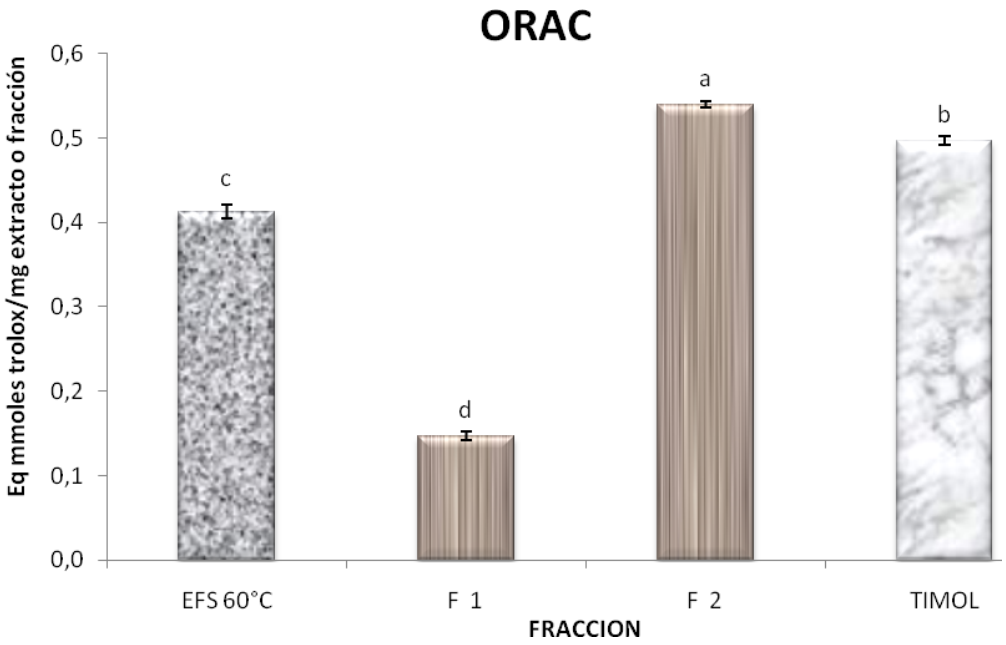
4.5.3. Ensayo de la capacidad de absorbancia del radical oxígeno ORAC

En el método de capacidad de absorbancia del radical oxígeno ORAC, la fracción 1 fue la de menor capacidad de evitar la decoloración de la fluoresceína (0,147 equivalentes de

mmoles trolox/mg extracto). La fracción 2 tuvo una mayor capacidad de inhibir la decoloración (0,539 equivalentes de mmoles trolox/mg extracto), superando el valor del extracto original (0,413 equivalentes de mmoles trolox/mg extracto) y así mismo al estándar de timol (0,496 equivalentes de mmoles trolox/mg sustancia), ver Figura 4-10.

La alta actividad de la fracción 2 podría ser debida a que ésta está conformada en mayor cantidad relativa por los compuestos oxigenados óxido de cariofileno y epóxido II humuleno. Así mismo dichos compuestos podrían estar aportando a la actividad de la fracción en comparación con el estándar de timol.

Figura 4-10: Actividad antioxidante medida por método de la capacidad de absorbancia del radical oxígeno ORAC del extracto obtenido por EFS a 110 bares y 60 °C de *Lippia origanoides* Kunth, sus respectivas fracciones y el estándar de timol. [a,b,c,d] Medias con letras diferentes indican diferencias significativas (P<0,05).

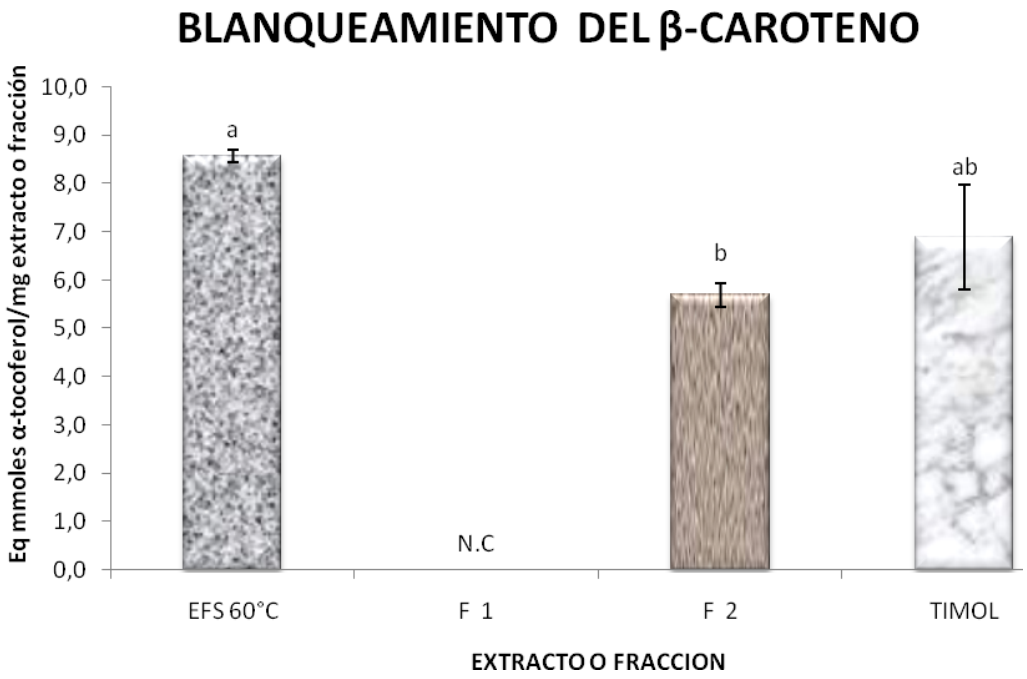


4.5.4. Ensayo blanqueamiento β-caroteno

En el método lipofílico del blanqueamiento del β-caroteno la fracción 1 no se pudo cuantificar por encontrarse fuera de la curva de calibración mientras que la fracción 2 presentó una actividad de 5,691 equivalentes de mmoles α-tocoferol/mg extracto, valor inferior al correspondiente del extracto inicial (8,574 equivalentes de mmoles α-tocoferol/mg sustancia), ver Figura 4-11.

Por otro lado, el estándar de timol presentó la misma capacidad de inhibir la decoloración del β-caroteno que el extracto inicial y su fracción 2 (6,895 equivalentes de mmoles α-tocoferol/mg sustancia) con un P<0,05.

Figura 4-11: Actividad antioxidante medida por método del blanqueamiento del β-caroteno del extracto obtenido por EFS a 110 bares y 60 °C de *Lippia origanoides* Kunth, sus respectivas fracciones y el estándar de timol. [a,b,c] Medias con letras diferentes indican diferencias significativas (P<0,05).



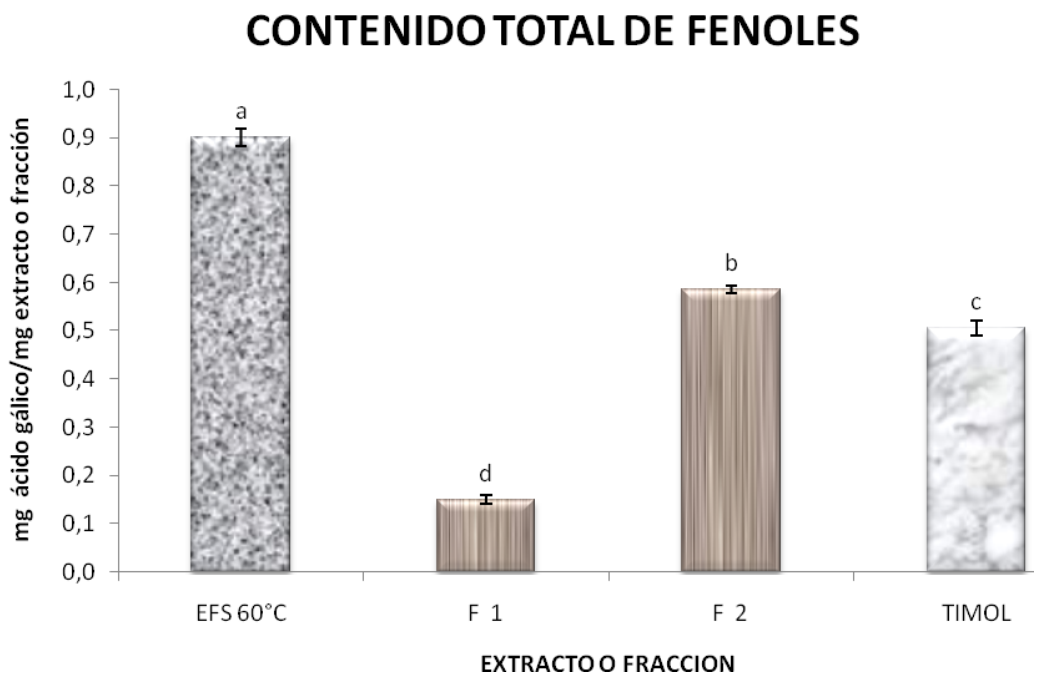
En el extracto total EFS 110 - 60 °C, el compuesto timol (99,99%) y los compuestos hidrocarburos sesquiterpénicos (trans-β-cariofileno y α-humuleno) podrían estar presentando un sinergismo o cooperativismo que podrían contribuir sobre todo en la actividad antioxidante. Los sesquiterpenos bicíclicos trans-β-cariofileno y α-humuleno a pesar de no contener grupos hidroxilos, podrían influir sobre la capacidad antioxidante y esto podría ser un caso similar con lo encontrado con el compuesto γ-terpineno, los cuales podrían presentar una alta protección lipofilica ó una buena interacción hidrofóbica como se observó en los aceites de té verde y de limón (Grabmann et al., 2001; Choi et al., 2000; Kim et al., 2004).

Con todo lo anterior el timol es el principal compuesto responsable del efecto antioxidante observado, como lo confirman otras investigaciones (Aeschbach et al., 1994; Schwarz et al., 1996). Así mismo hay una influencia del método usado sobre la actividad antioxidante como lo evidencian (Dapkevicius et al., 1998; Fadel et al., 1999; Mantle et al., 1998).

4.5.5. CONTENIDO TOTAL DE FENOLES

En la fracción 1 el CTF fue de (0,150 mg ácido gálico/mg extracto) en comparación con la fracción 2 que presentó un mayor CTF (0,585 mg ácido gálico/mg extracto); estos valores fueron inferiores al determinado en el extracto inicial (0,901 mg ácido gálico/mg extracto), ver Figura 4-12. Por su parte, el estándar de timol tuvo un menor CTF (0,506 mg ácido gálico/mg sustancia).

Figura 4-12: Contenido total de fenoles presente en el extracto obtenido por EFS a 110 bares y 60 °C de *Lippia origanoides* Kunth, sus respectivas fracciones y el estándar de timol. [a,b,c,d] Medias con letras diferentes indican diferencias significativas (P<0,05).



El valor en CTF en el extracto total es atribuido principalmente al alto contenido en timol (99%), el cual es más reactivo que el acetato de timilo (2,6%); de forma general se ha observado que ciertos aspectos estructurales, como la presencia de un grupo hidroxilo pueden contribuir a la reactividad. La estructura de los polifenoles determina su capacidad antioxidante, lo que ha provocado que se hayan publicado un gran número de trabajos estudiando este aspecto (Rice et al., 1996; Villaño et al., 2005; Siquet et al., 2006; Lemanska et al., 2001).

En resumen en cuanto a la actividad antioxidante y al CTF, el timol por su habilidad para donar hidrógenos, posiblemente facilita la reducción de los radicales (Schlesier et al., 2002; Brand et al., 1995). Por su parte, los sesquiterpenos hidrocarbonados trans-β-cariofileno y α-humuleno, que aunque no presenten grupos hidroxilo, podrían hacer que

en conjunto con los otros compuestos actuen produciendo un efecto sinergístico reflejado así mismo en la actividad. Para corroborar este efecto se tendría que realizar pruebas con los compuestos individuales y en mezclas.

En la Tabla 4-6 se presenta el factor actividad antioxidante/contenido total de fenoles que mide el potencial de la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos que están contenidos en el extracto total EFS 110 bar-60 °C ó en cada fracción.

Tabla 4-6: Potencialidad de los fenoles del extracto total EFS 110 bar-60 °C y de sus fracciones de *L. origanoides* Kunth del Alto Patia

	EFS 110 BAR–60°C	**FRACCION 1**	**FRACCION 2**
DPPH/CTF (mmol Trolox/mg ácido gálico)	0,94b	0,01c	**1,87a**
FRAP/CTF (mmol Trolox/mg ácido gálico)	1,42a	N.C	**1,51a**
ORAC/CTF (mmol Trolox/mg ácido gálico)	0,46b	0,98a	**0,92a**
BET/CTF (mmol α Tocoferol/mg ácido gálico)	9,52a	N.C	**9,72a**

Análisis de medias por filas. [a,b,c,] Medias con letras diferentes indican diferencias significativas (P<0,05).

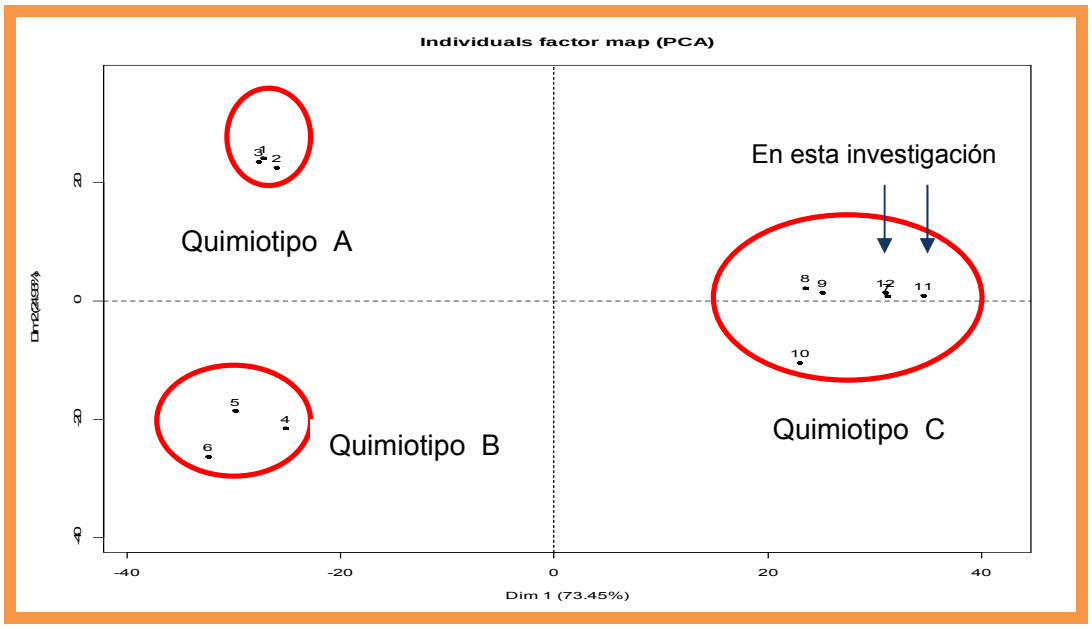
Dichos valores permiten inferir que los compuestos presentes en la Fracción 2 son mucho más activos que los presentes en la Fracción 1 y similares a los presentes en el extracto inicial EFS 110 bar-60 °C, con un P<0,05. Al comparar los resultados obtenidos en esta investigación para el caso del factor de DPPH/CTF se observa que el valor aquí obtenido (1,87 mmol trolox/mg ácido gálico) es mayor que el encontrado en otros estudios de extractos fenólicos de semillas de Guava (*Psidium guajava* L.) donde encontraron un valor de 1,29 mmol trolox/mg AG (Hernandez et al., 2011) y 0,89 mmol trolox/mg AG (Castro et al., 2010). En concordancia con otra investigación Shui y Leong en residuos de *Averrhoa carambola* encontraron un coeficiente mucho más bajo (0,06 mmol trolox/mg AG) (2006).

4.6. Estudios de correlación

El anterior conjunto de datos permite realizar diferentes estudios, mediante diferentes métodos estadísticos, con miras a visualizar las correlaciones existentes entre los métodos de determinación de actividad antioxidante y CTF, y su posible incidencia sobre la capacidad antioxidante (ver 4.6.1.), así como la correlación entre los componentes de los extractos obtenidos con la correspondiente capacidad antioxidante (numeral 4.6.2.).

Con anterioridad a los estudios planteados, teniendo en cuenta el estudio de análisis de componente principal (ACP) realizado por Stashenko et al. (2010), se realizó el ACP incluyendo los datos obtenidos en este trabajo (números 11 y 12), lo que permitió evidenciar que la *L. origanoides* estudiada pertenece al quimiotipo C, el cual se caracteriza por tener un alto contenido de timol (Figura 4-13).

Figura 4-13: Relaciones de similaridad entre los 10 aceites esenciales estudiados anteriormente, con los aceites esenciales por arrastre con vapor e hidrodestilación de esta investigación, por medio del Análisis de Componentes Principales (ACP)



4.6.1. Correlación entre los métodos de determinación de actividad antioxidante y CTF, posible incidencia sobre la capacidad antioxidante

La correlación del contenido total de fenoles y los diferentes métodos de determinación de actividad antioxidante para los extractos de *L. origanoides* Kunth del Alto Patía se presenta en la Tabla 4-7. Se observa que hay correlacionan de manera significativa

DPPH y ORAC (76,27%), DPPH y BET (81,48%), DPPH y CTF (69,25%), BET y ORAC (74,60%), ORAC y CTF (69,35%), al igual que BET y CTF (87,69%). Existe correlación entre métodos de transferencia de protones y de transferencia de electrones; sin embargo, FRAP fue la única técnica que no correlacionó.

Tabla 4-7: Correlación entre el contenido total de fenoles y actividad antioxidante de los extractos de *L. origanoides* Kunth del Alto Patía mediante las diferentes técnicas de extracción

VARIABLES	DPPH	FRAP	ORAC	BET	CTF
DPPH	1,0000	-0,3394[a] 0,2805[b]	**0,7627** **0,0015**	**0,8148** **0,0041**	**0,6925** **0,0061**
FRAP		1,0000	0,1218 0,6917	-0,2960 0,4394	-0,3122 0,2990
ORAC			1,0000	**0,7460** **0,0132**	**0,6935** **0,0041**
BET				1,0000	**0,8769** **0,0009**
CTF					1,0000

a: Coeficiente de correlación Pearson´s
b: Probabilidad < 0,05

En este estudio de *L. origanoides* del Alto Patía el CTF correlacionó con las técnica de actividad antioxidante DPPH, ORAC y BET, contrario a lo reportado por otros autores; p.e. Dorman et al. no obtuvieron una correlación en diferentes fuentes naturales, incluyendo extractos de plantas tales como el orégano (2003), y Kahkonen et al. reportaron que no existe correlación significativa en 92 extractos de plantas estudiadas, debido a que los compuestos fenólicos presentan diferente respuesta colorimétrica usando el reactivo de Folin (1999). De manera similar la respuesta molecular antioxidante a los radicales libres varía notablemente, dependiendo de la estructura química y las condiciones de oxidación (Muchuwetti et al., 2006). Adicionalmente, el efecto sinergístico de los polifenoles con uno u otro componente presente en un extracto puede contribuir al total de la actividad antioxidante observada (Shahidi et al., 1994).

Teniendo en cuenta la alta correlación existente entre el método BET y DPPH (los cuales miden la actividad antioxidante lipofílica) y entre BET y ORAC (los que miden la transferencia de protones), se procedió a determinar la capacidad antioxidante en función de los métodos DPPH, ORAC y FRAP (Ecuación 5), así como la contribución de cada uno de éstos a dicha capacidad (Tabla 4-8).

CA = DPPH + FRAP + ORAC **Ecuación 5**

La capacidad antioxidante calculada presentó el siguiente orden descendente: BHT, F2, EFS 60 °C, AV, HD, Timol, EFS 40 °C, O. vulgare, EFS 50 °C y F1. Siendo EFS 60 ºC y F2 estadísticamente iguales.

Por otra parte, en la mayoría de extractos, la contribución dada a la capacidad antioxidante por FRAP fue mayor y predominó sobre DPPH, siendo ORAC el que menos aporta a dicha capacidad (menos del 21%).

Tabla 4-8: Capacidad antioxidante de los extractos de *L. origanoides* Kunth del Alto Patia, *O. vulgare*, BHT y el timol.

EXTRACCION	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (mmoles trolox/mg extracto o fracción)	APORTE DPPH %	APORTE FRAP %	APORTE ORAC %
AV	2,37 bc	30,81 c	52,93 b	16,74 d
HD	2,28 bcd	31,74 c	51,28 b	16,98 d
EFS 110 bar - 40°C	2,23 bcd	40,95 b	40,32 c	18,73 cd
EFS 110 bar - 50°C	1,94 d	43,31 b	35,88 cd	20,81 bc
EFS 110 bar - 60°C	2,51 b	33,68 c	50,01 b	16,30 d
O. vulgare	1,98 cd	24,55 d	53,33 b	22,12 b
BHT	3,74 a	72,51 a	25,32 e	2,17 e
F1	0,15 e	1,07 f	0,00 f	98,93 a
F2	2,56 b	43,42 b	35,15 d	21,44 b
Timol	2,26 bcd	7,01 e	70,47 a	22,52 b

[a-f] Medias con letras diferentes indican diferencias significativas (P<0,05).

Con lo anteriormente obtenido, la mayor capacidad antioxidante de L. origanoides Kunth del Alto Patía lo presentó el extracto obtenido mediante EFS 110 bar-60 °C (2,51 equivalentes de mmoles trolox/mg extracto), siendo al mismo tiempo estadísticamente igual que su fracción 2 (2,56 equivalentes de mmoles trolox/mg fracción) con un P<0,05 y mayor al valor obtenido por el estándar de timol (2,26 equivalentes de mmoles trolox/mg sustancia). La suma de los valores aportados por las actividades hidrofílicas (FRAP y ORAC), para los extractos obtenidos, fue en promedio de 64%, similar a lo encontrado por Arnao et al. (2001) en vegetales donde reportaron valores en un rango de 64% a un 80%. Sin embargo, dicho valor para F2 disminuyó al 57%.

En conclusión, los extractos de *L. origanoides* obtenidos por los métodos basados por transferencia de electrones (DPPH y FRAP), aportan en mayor proporción al total de la capacidad antioxidante que el método basado en transferencia de átomos de hidrógeno (ORAC). En cuanto al carácter hidrofílico o lipofílico de la capacidad antioxidante (FRAP+ORAC vs DPPH) de los extractos obtenidos, éste es intermedio al del timol (claramente hidrofílico, con un 93% en FRAP+ORAC) y al del BHT (claramente lipofílico, con un 73% en DPPH).

La actividad antioxidante de los compuestos polifenólicos ha sido asociada a sus características químicas estructurales como la capacidad de donación de protones del hidroxilo fenólico, la capacidad de deslocalizar y estabilizar electrones desapareados por resonancia en el anillo aromático, bajo potencial de oxidación (alto potencial de reducción) y alta capacidad de quelación de metales los cuales tienen interacción con otras moléculas fácilmente oxidables (Rice et al., 1996).

Finalmente, la correlación entre CTF y su actividad antioxidante tanto del aceite esencial de *L. origanoides* del Alto Patía como de sus respectivas fracciones se observa en la Tabla 4-9. Se presenta una correlación altamente significativa e inversa entre la técnica DPPH con FRAP (93,39%), así como entre FRAP y ORAC (96,18%) y entre ORAC y BET (99,22%). Por otra parte, se observa una correlación directa, altamente significativa, entre DPPH con ORAC (99,02%) y con CTF (75,75%), así como entre FRAP con BET (98,36%) y con CTF (98,49%) y BET con CTF (98,99%). Al observar que la correlación entre las diferentes variables es mayor para las fracciones con el extracto original (EFS 60 ºC), que para el conjunto de extractos, se hace evidente la alta similitud entre F2 y EFS 60 ºC; por lo cual puede concluirse que no es conveniente someter dicho extracto al proceso de fraccionamiento efectuado. En este caso, existe correlación entre métodos de transferencia de protones y transferencia de electrones.

Los resultados aquí obtenidos se encuentran dentro de lo reportado por otros autores, p.e. Velioglu et al., en un estudio de actividad antioxidante y fenoles totales de 28 productos de origen vegetal, reportaron una fuerte correlación entre fenoles totales y actividad antioxidante en semillas de lino (R^2 =0.963; p < 0.001) y cereales (R^2 =0.905; p < 0.001) (1998). Thaipong et al. determinaron que FRAP, es el método que mejor correlaciona con el contenido total de fenoles y que es el que presenta la sensibilidad más alta; sin embargo en este estudio aunque correlaciona es mayor su correlación con BET (98,9%); también encontraron que DPPH presenta una correlación altamente significativa con las técnicas de ORAC y FRAP, al mismo tiempo ORAC se correlaciona con la técnica de reducción del hierro (FRAP) (2006). Sin embargo, en otros estudios como el realizado por Ou et al. reportaron que no había correlación entre la actividad antioxidante de las técnicas FRAP y ORAC entre la mayoría de muestras de vegetales liofilizados (927) (2002), en contraposición con lo encontrado en muestras de frutas de arándano donde si presentaron una alta correlación (Connor et al., 2002).

Tabla 4-9: Correlación entre contenido total de fenoles y actividad antioxidante del extracto total EFS 110 bar-60 °C y de sus fracciones de *L. origanoides* Kunth del Alto Patía.

VARIABLES	DPPH	FRAP	ORAC	BET	CTF
DPPH	1,0000	**- 0,9339[a]**	**0,9902**	- 0,9264	**0,7575**
		0,0202[b]	**<,0001**	0,0736	**0,0486**
FRAP		1,0000	**- 0,9618**	**0,9836**	**0,9849**
			0,0022	**0,0164**	**0,0003**
ORAC			1,0000	**- 0,9922**	0,6538
				0,0078	0,0787
BET				1,0000	**0,9899**
					0,0100
CTF					1,0000

a: Coeficiente de correlación Pearson´s
b: Probabilidad < 0,05

Es importante mencionar que los resultados obtenidos por Prior et al. mostraron que existe una considerable correlación (79,19%) entre los polifenoles extraíbles y la actividad antioxidante determinada por el método FRAP, aunque no llegó a ser significativa (p =0,066). En cualquier caso, esta tendencia podría indicar que los polifenoles son uno de los principales antioxidantes en su estudio (2005).

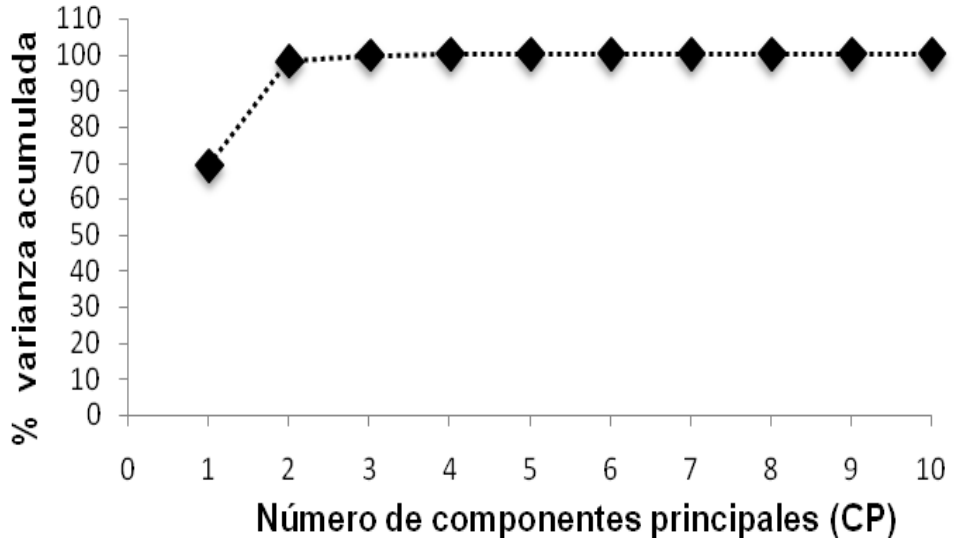
4.6.2. Correlación entre la composición química y la actividad antioxidante de *Lippia origanoides*

Estudios previos han demostrado, que la composición del aceite esencial y las propiedades antioxidantes pueden cambiar dependiendo del cultivo, origen, etapa vegetativa y estación de crecimiento de la planta (Dambolena et al., 2010; Arana et al., 2010). En algunos casos la actividad antioxidante no parece depender del contenido de fenoles, entonces, vale la pena destacar que la relación entre el contenido de antioxidantes particulares y la capacidad antioxidante es difícil de explicar, ya que la acción sinérgica que tienen lugar entre los constituyentes fenólicos presentes en extractos naturales contribuye a las diferencias en la habilidad antioxidante de los extractos de las plantas. Rice et al. (1996) y Mucheuwetti et al. (2007) sugieren que las características de los compuestos fenólicos podrían afectar la actividad antioxidante, por ejemplo la substitución orto por donación de electrones alquilo o grupos metoxi de los

fenoles aumenta la estabilidad de los radicales libres y por consiguiente su potencial antioxidante.

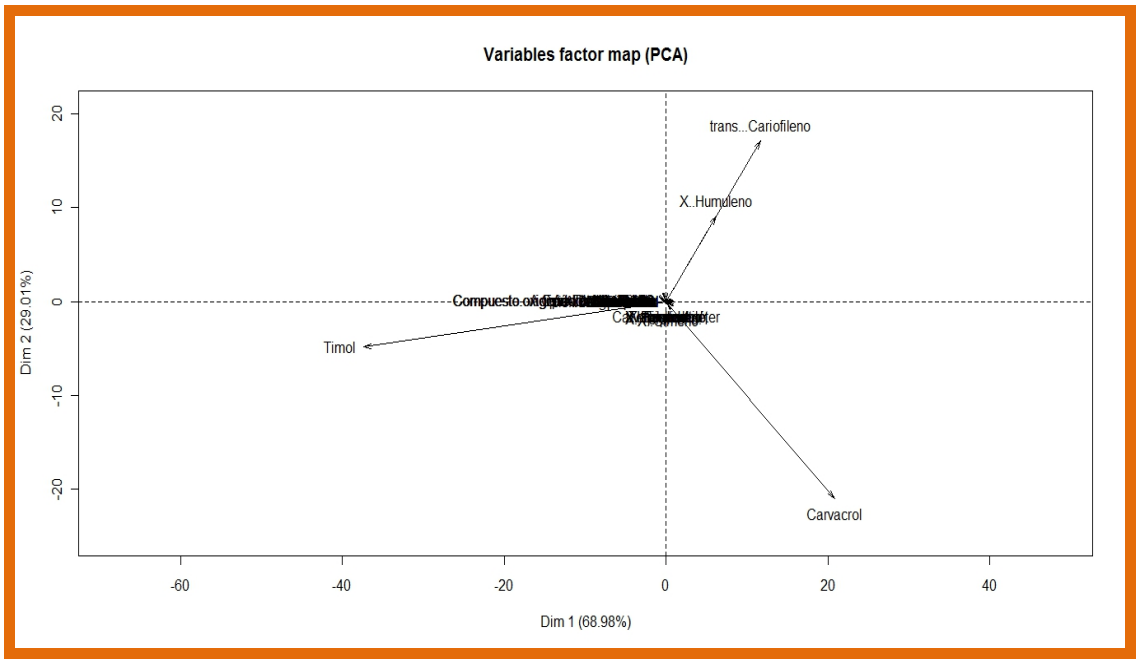
En esta parte del trabajo se realizó un análisis de componentes principales (ACP) con el fin de seleccionar los compuestos que resumen la mayor parte de la variación de los datos (Hotelling, 1993; Calvo et al, 2006). En la Figura 4-13 se presenta la varianza acumulada obtenida de la relación entre la composición de los extractos de *Lippia origanoides* obtenidos por AV, HD, EFS y el control de *O. vulgare*. Los componentes principales (CP) representan combinaciones lineales de las concentraciones relativas de los compuestos presentes en los extractos obtenidos. El CP 1 representa una varianza acumulada del 68.98%, el CP 2 el 97.99%, el CP3 el 99,75%, el CP 4 el 99,97%, el CP 5 el 99,99%, el CP 6 es el 100% y el CP 7-10 es el 100%. Con lo obtenido anteriormente se podría explicar el total de la varianza con los 2 primeros componentes principales.

Figura 4-14: Porcentajes de la varianza acumulada obtenida para los factores extraídos del Análisis de Componentes Principales (ACP).



De acuerdo al ACP, los compuestos timol, carvacrol, trans - β-cariofileno y α-humuleno contribuyen de forma significativa al CP 1, representando el 68,98% de la información. Los compuestos ρ-cimeno y acetato de timilo aportan significativamente al CP 2, el cual constituye el 29,01% de la varianza (Figura 4-14).

Figura 4-15: Agrupamientos dados por el CP 1 y CP 2 del Análisis de Componentes Principales (ACP).



Teniendo en cuenta lo encontrado se realizó en esta última etapa del trabajo, la Regresión Lineal Múltiple (RLM) para evaluar los compuestos de mayor variación (timol, carvacrol, trans-β-cariofileno, α-humuleno, ρ-cimeno y acetato de timilo) y su influencia sobre cada una de las variables que determinan la actividad antioxidante. Donde las diferentes actividades antioxidantes son las variables dependientes y los componentes de los extractos son las variables independientes.

En la Tabla 4-10 se presentan los resultados de la correlación entre las actividades calculadas y observadas con sus respectivos parámetros estadísticos; valores de R^2 y F. Es importante mencionar que de los 6 compuestos arrojados del ACP, los compuestos ρ-cimeno y el carvacrol no son importantes para la actividad antioxidante.

Al comparar los resultados experimentales con los resultados calculados obtenidos mediante RLM, se encontró que en el modelo es acertado para describir la actividad antiradicalaria DPPH los compuestos timol y α-humuleno con una correlación de (0,814 y 0,9505, respectivamente). El $F_{cal} > F_{tab}$, lo que indica que la regresión es estadísticamente significativa a un nivel α=0,05.

Tabla 4-10: Coeficientes de regresión, obtenidos mediante Regresión Lineal Múltiple para los compuestos de mayor variación (timol, carvacrol, acetato de timilo, ρ-cimeno, trans- β-cariofileno y α-humuleno) usando las técnicas de actividad antioxidante de los extractos de *L. origanoides* Kunth del Alto Patía. Un R^2 y $R^2_{Ajustado}$ mayor que 0,9 y un F_{cal} mayor que su F_{tab}, indica que el ajuste de los datos calculados y los datos experimentales es estadísticamente significativo. Análisis a un límite de confianza del 95.

VARIABLE		TIMOL	ACETATO DE TIMILO	TRANS- β-CARIOFILENO	α-HUMULENO
DPPH	ERROR ESTANDAR	0,00108			0,00366
	Pr > F	0,0022			0,0138
	R^2	0,814			0,9505
	R^2 Ajustado	0,814			0,1365
	F calculado	26,26			13,77
	F tablas	5,99			5.79
Blanqueamiento del β-Caroteno	ERROR ESTANDAR	0,00788	0,11654		
	Pr > F	0,0058	0,0004		
	R^2	0,9865	0,8886		
	R^2 Ajustado	0,0979	0,4417		
	F calculado	28,91	19,82		
	F tablas	6,59	5,79		
FRAP	ERROR ESTANDAR			0,03103	
	Pr > F			0,0033	
	R^2			0,7878	
	R^2 Ajustado			0,7878	
	F calculado			22,27	
	F tablas			5,99	
ORAC	ERROR ESTANDAR			0,00079324	
	Pr > F			0,0013	
	R^2			0,8417	
	R^2 Ajustado			0,8417	
	F calculado			31,91	
	F tablas			5,99	
CONTENIDO TOTAL DE FENOLES	ERROR ESTANDAR	0,0016			
	Pr > F	0,0152			
	R^2	0,5475			
	R^2 Ajustado	0,5475			
	F calculado	7,26			
	F tablas	5,99			

Con los resultados calculados obtenidos mediante RML, se encontró que el modelo es acertado en el BET para los compuestos fenilpropanoides timol y acetato de timilo con

una correlación (0,9865 y 0,8886, respectivamente). De igual forma, se encontró que el modelo es acertado en la reducción del Fe^{+3} a Fe^{+2} (FRAP) y en la absorbancia del radical oxígeno ORAC principalmente por el compuesto trans- β-cariofileno (R^2=0,7878 y 0,8417, respectivamente). El $F_{cal} > F_{tab}$, lo que indica que la regresión es estadísticamente significativa a un nivel α=0,05.

Al comparar los resultados experimentales con los resultados calculados obtenidos mediante RLM, se encontró que el modelo relaciona el contenido total de fenoles con el compuesto fenilpropanoide timol (R^2=0,5475). El $F_{cal} > F_{tab}$, lo que indica que la regresión es estadísticamente significativa a un nivel α=0,05.

En conclusión el timol afecta directamente las actividades presentadas por el método DPPH, BET y el CTF. El compuesto acetato de timilo aporta en el método lipofílico BET y el α-humuleno aporta en el método DPPH. Por otro lado el compuesto trans-β-cariofileno aporta en las actividades de FRAP y ORAC.

4.7. Aplicación promisoria del AEO

Respecto a los resultados relacionados con el poder protector del AEO frente a la oxidación lipídica en huevos, se observó que el efecto del almacenamiento, tipo de aceite y nivel de timol fue altamente significativo (P<0,0001) sobre la concentración de MDA en la yema de huevo, los contrastes realizados para comprender las tendencias obtenidas en el estudio sobre la estabilidad oxidativa de la yema de huevo se presentan en la Tabla 4-11.

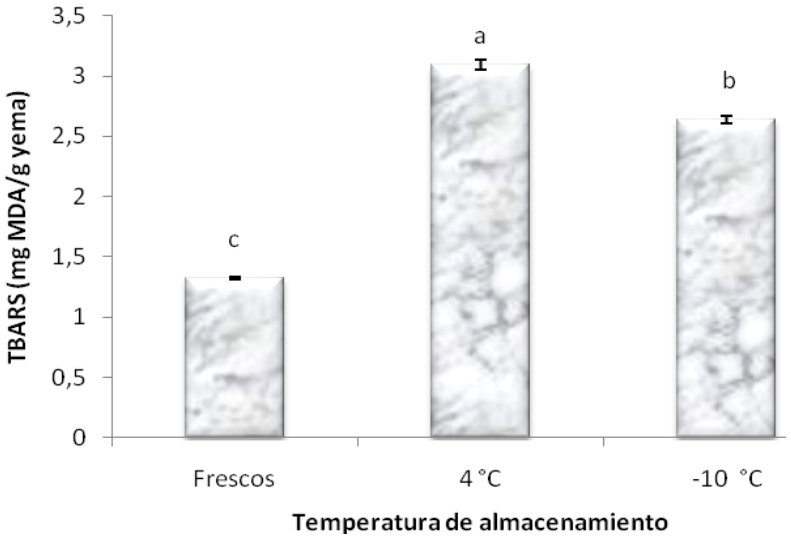
Tabla 4-11: Contrastes de acuerdo a un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3 x 2 x 4.

CONTRASTE	Diferencia	Pr > |t|	
Fresco vs almacenado	-1,55	<.0001	***
Almacenado -10 °C vs 4 °C	-0,45	0,0022	**
Frescos Palma vs Pescado	-0,15	0,1896	ns
Frescos Palma Con vs Sin AEO	-0,39	0,0329	*
Frescos Palma MT vs otros	0,07	0,724	ns
Frescos Palma AT vs BT	-0,09	0,6929	ns
Frescos Pescado Con vs Sin AEO	0,35	0,0593	T
Frescos Pescado MT vs otros	0,39	0,0488	*
Frescos Pescado AT vs BT	0,16	0,4661	ns
4 °C Palma vs Pescado	-1,20	<.0001	***
4 °C Palma Con vs Sin AEO	-0,87	0,0101	**
4 °C Palma MT vs otros	0,75	0,0353	*
4 °C Palma AT vs BT	0,14	0,7275	ns
4 °C Pescado Con vs Sin AEO	-2,54	<.0001	***
4 °C Pescado MT vs otros	-0,20	0,5784	ns
4 °C Pescado AT vs BT	0,43	0,2982	ns
-10 °C Palma vs Pescado	-0,86	<.0001	***
-10 °C Palma Con vs Sin AEO	0,16	0,6274	ns
-10 °C Palma MT vs otros	-0,12	0,7292	ns
-10 °C Palma AT vs BT	0,37	0,3684	ns
-10 °C Pescado Con vs Sin AEO	-0,34	0,3072	ns
-10 °C Pescado MT vs otros	-0,24	0,4995	ns
-10 °C Pescado AT vs BT	0,28	0,4978	ns

La estabilidad lipidíca de las yemas fue significativamente diferente (P<0,05) entre temperaturas de almacenamiento, siendo mayor el contenido de MDA en los huevos almacenados por 6 meses a 4 ºC y -10 ºC en comparación con los huevos frescos en un

134% y 100%, respectivamente (Figura 4-15). Este resultado es diferente al obtenido por Radwan et al., (2008) quienes evaluaron la inclusión de antioxidantes naturales sobre la estabilidad oxidativa de huevos en almacenamiento a temperatura ambiente (16±2 ºC) y cuyos resultados les permitieron sugerir que el almacenamiento de los huevos no fue de mayor importancia sobre la estabilidad oxidativa, incluso afirmaron que éstos presentaron algún tipo de capacidad antioxidante intrínseca que permitía el mantenimiento del sabor de los mismos en almacenamientos prolongados. Florou-Paneri et al., (2005a, b) y Botsoglou et al., (1997) sugieren en sus estudios, que el MDA encontrado en la yema no puede producirse durante el almacenamiento de los huevos, pero puede estar presente en la yema de huevos frescos, tal presencia puede ser atribuida al consumo y posterior deposición de MDA presente en las dietas o a la producción in vivo de MDA por parte de las gallinas durante el ensayo. La posible transferencia de los constituyentes antioxidantes del aceite esencial de orégano o α-tocoferol en el organismo de la gallina a través de la alimentación podría inhibir las reacciones en cadena involucradas en la oxidación de los lípidos consumidos, reduciendo de esta manera los productos oxidados que son transferidos a la yema.

Figura 4-16: Efecto del almacenamiento sobre el contenido de malonaldehído en yemas de huevo (mg MDA/g yema de huevo).

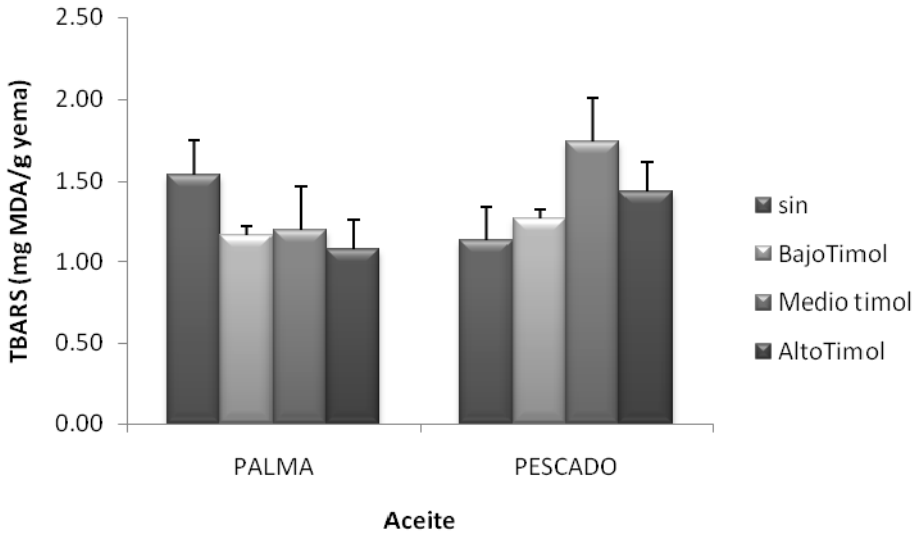


Por otro lado los resultados evidencian que tanto en los análisis en fresco como en almacenamiento a 4 ºC y -10 ºC, la concentración de MDA en la yema de huevos provenientes de ponedoras suplementadas con aceite de palma como fuente de ácidos grasos saturados (1,98 mg/g de yema) fue menor al valor observado en dietas con aceite de pescado como fuente ácidos grasos insaturados (2,72 mg/g de yema), este resultado

puede atribuirse a una mayor presencia de enlaces dobles generada por el enriquecimiento de las yemas de huevo con ácidos grasos poli insaturados, y que es favorecido por la manipulación del perfil de ácidos grasos de la yema, el cual, es claramente afectado por el perfil de lípidos de la dieta, particularmente ácidos poli insaturados, factor que los hace más propensos a la oxidación durante el almacenamiento (Radwan et al*.,* 2008; Shimizu et al., 2001; Meluzzi et al., 2000). El aceite de palma se compone en un 50% de acido palmítico, un ácido graso saturado de dieciséis átomos de carbono, y en menor proporción de ácidos grasos mono insaturados y poli insaturados (10%); en comparación con el aceite de pescado, éste está compuesto por ácidos grasos omega 3, que son de diferentes tipos principalmente ácido alfa-linolénico (ALA) 18:3 (n-3), ácido eicosapentaenoico (EPA) 20:5 (n-3) y ácido docosahexanoico (DHA) 22:6 (n-3). La oxidación lipídica no solo es más susceptible por el número de instauraciones, sino por la longitud de la cadena (Pokorny et al., 2001).

La estabilidad oxidativa de huevos frescos provenientes de gallinas alimentadas con aceite de palma y que no fueron suplementadas con AEO fue menor en comparación con huevos de gallinas alimentadas con el mismo aceite y suplementadas con el AEO en cualquiera de los niveles de timol usados, los valores obtenidos fueron de 1,54, 1,17, 1,19 y 1,08 mg MDA/g de yema para Pal, Pal-BT, Pal-MT y Pal-AT, respectivamente. Para los huevos de ponedoras con aceite pescado, la mayor oxidación lipídica en la yema se observó en la dieta con nivel medio de timol en comparación con las otras relaciones de timol y la dieta control de pescado, con 1,74, 1,27, 1,43 y 1,13 mg MDA/g de yema para Pes-MT, Pes-BT, Pes-AT y Pes, respectivamente. (Figura 4-16).

Figura 4-17: Efecto del tipo de aceite y relación de timol sobre el contenido de malonaldehído en yemas de huevo fresco (mg MDA/g yema de huevo)

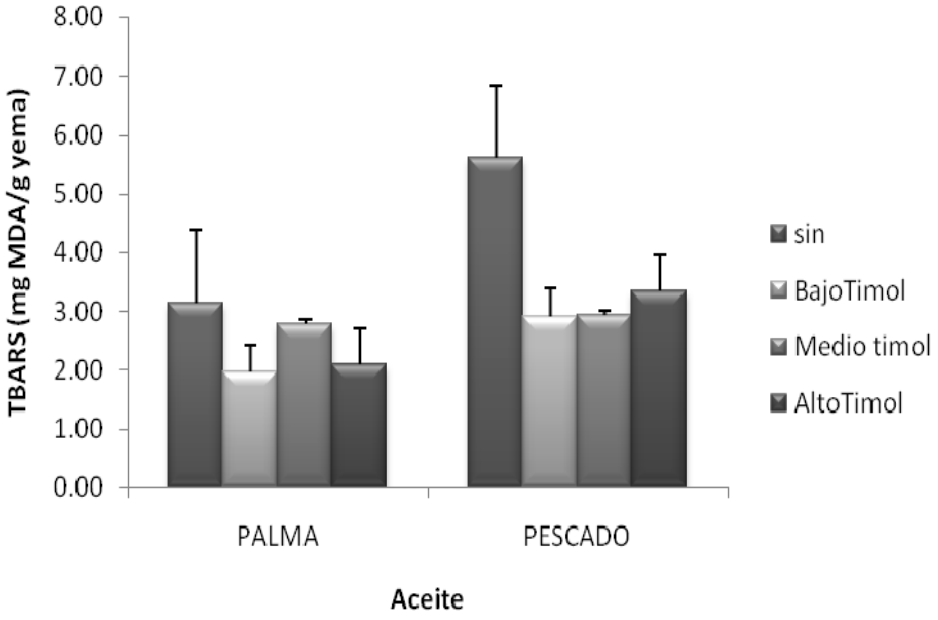


Los huevos almacenados a 4 ºC, de gallinas alimentadas con palma y sin suplementación de AEO, mostraron la mayor oxidación en comparación con la inclusión del AEO en la dieta; dentro de los niveles de AEO, bajo timol y alto timol presentaron la

mejor estabilidad lipídica en comparación con los huevos de ponedoras suplementadas con la relación media del compuesto fenólico (3,15, 1,95, 2,78 y 2,10 mg MDA/g de yema para Pal, Pal-BT, Pal-MT y Pal-AT, respectivamente) (Figura 4-17).

Por otro lado, la estabilidad oxidativa de los lípidos en la yema de huevos obtenidos de gallinas alimentadas con aceite de pescado suplementadas con el AEO en las tres relaciones de timol fue mejor que la observada en las yemas de huevo de aves con la dieta control de aceite de pescado (3,05 y 5,60 mg MDA/g yema para Pes-Control y Pescado suplementado con AEO, respectivamente); dentro de los niveles de timol, el contenido de MDA fue superior en nivel alto de timol, respecto a las otras dos con 3,33, 2,91 y 2,92 mg MDA/g de yema para Pes-AT, Pes-MT y Pes-BT, respectivamente.

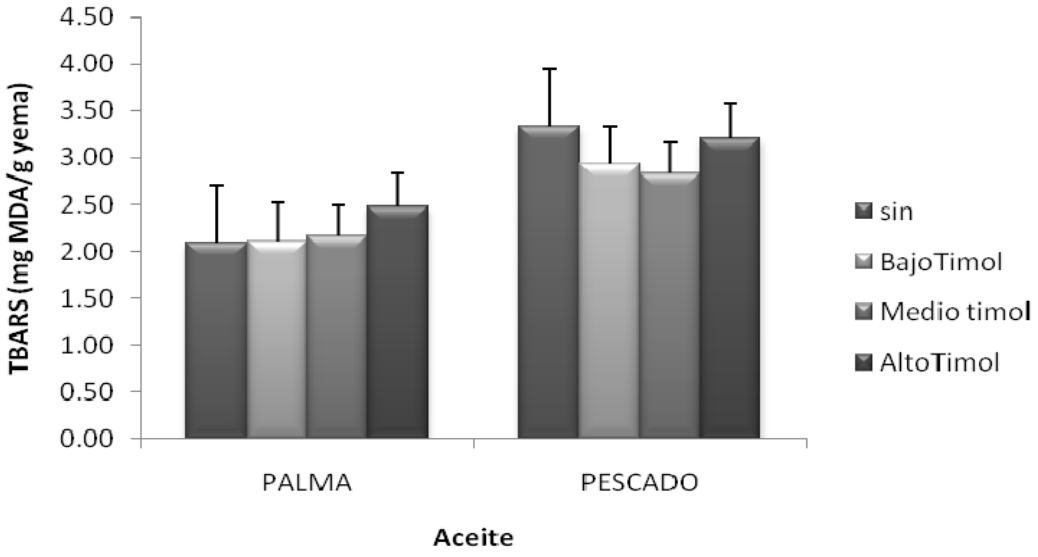
Figura 4-18: Efecto del tipo de aceite y relación de timol sobre el contenido de malonaldehído en yemas de huevo almacenado a 4ºC (mg MDA/g yema de huevo)



Para el almacenamiento a -10 ºC, no se encontraron diferencias significativas (P>0.05) en la concentración de MDA en la yema de huevo dentro de los tratamientos con aceite de palma, para los diferentes niveles de AEO suplementados y el control (Figura 4-18). Por otra parte los efectos observados en los huevos con aceite de pescado, la concentración de MDA fue mayor en el tratamiento sin suplementar respecto a los tratamientos suplementados con el AEO, sin embargo no se observó una tendencia clara en los diferentes niveles de inclusión del AEO en cada tipo de aceite (Palma o pescado).

Los resultados obtenidos en este estudio para la inclusión de AEO son similares a los obtenidos por Florou-Paneri et al. donde encontraron que la inclusión de este aceite (100 mg/kg), sin ser mejor que el uso de α-tocoferol (vitamina E), mostró valores más bajos de MDA respecto al tratamiento sin suplementar (Dieta basal maíz – soya) (2005a) y concuerdan con los resultados reportados por Radwan et al. donde la adición de 1% de orégano o romero en la dieta de las gallinas redujo los valores de MDA en comparación con la dieta sin suplementar, pero sin ser superiores a los valores obtenidos con las dietas suplementadas con vitamina E (100 o 200 mg/Kg) (2008). Botsoglou et al. valoraron el efecto del tomillo dietario sobre la estabilidad oxidativa de huevos almacenados, encontrando un menor valor de MDA en la yema de huevos de gallinas suplementadas con 3% de tomillo en la dieta (1997). Sin embargo, Galobart et al., quienes trabajaron con aceite de romero, no encontraron efecto antioxidante en la prevención de la oxidación en huevos enriquecidos con ácidos grasos ω3 en cualquiera de los niveles de inclusión de extractos de romero (2001).

Figura 4-19: Efecto del tipo de aceite y relación de timol sobre el contenido de malonaldehído en yemas de huevo almacenado a -10 ºC (mg MDA/g yema de huevo).



La estabilidad oxidativa lograda con la inclusión del AEO puede atribuirse a la capacidad antioxidante que tienen los principales componentes de este aceite, carvacrol y timol, cuya actividad antioxidante es debida a la presencia de grupos OH fenólicos los cuales actúan como donadores de hidrogeno a los radicales peróxido producidos durante el primer paso de la oxidación lipidíca, retardando de esta forma la formación de la hidroxil peroxidasa (Radwan et al., 2008; Adam et al., 1998).

En conclusión el uso de fuentes de ácidos grasos insaturados como el aceite de pescado en la dieta de ponedoras incrementó la susceptibilidad a la oxidación lipidíca comparado con la inclusión de aceite de palma (la concentración de MDA en yema fue mayor en un 37% en los tratamientos con aceite de pescado). Por otro lado, el efecto de la inclusión del AEO favoreció la estabilidad oxidativa de la yema de los huevos frescos y almacenados a 4 ºC; en el caso del almacenamiento a -10 ºC, no fue clara la tendencia en la concentración de MDA, especialmente en los tratamientos con aceite de pescado, resultado que pudo generarse por la temperatura, es decir que pudo ejercer algún tipo de efecto inhibitorio en las reacciones en cadena generadas en el proceso de oxidación lipidíca. En cuanto a los resultados de las relaciones de timol evaluadas, en fresco, el contenido de MDA en la yema de huevo fue un 25% más bajo en las dietas de palma suplementadas con el AEO en comparación con la dieta sin inclusión del aceite esencial, a 4 ºC fue menor el contenido de MDA en un 27.7% para las dietas de palma suplementadas con el AEO respecto a la dieta sin inclusión del aceite, mientras que para las dietas de aceite de pescado con la adición del AEO, el MDA encontrado en la yema de los huevos fue un 45.5% más bajo en comparación con la dieta de pescado sin AEO. Los resultados muestran el potencial de uso del AEO como antioxidante natural en sistemas de alimentación de ponedoras, lo cual abre una posibilidad interesante al permitir la inclusión de una alternativa natural de estabilización de productos enriquecidos con fuentes de ácidos grasos poli insaturados.

La conclusión general en este ensayo in vivo es que el AEO tuvo efecto positivo cuando los huevos se encontraban almacenados a 4°C y sin efecto en almacenamiento a -10°C. los diferentes niveles (BT, MT, AT) no presentó un efecto significativo por lo tanto los AEO mejoran la estabilidad oxidativa de la yema sin considerar los diferentes niveles. Los AEO mostraron potencial antioxidante sobre la yema de huevo de gallinas alimentadas con dietas formuladas con aceite de pescado, aspecto que confirma su valor promisorio como aditivo funcional en sistemas de alimentación de ponedoras. Los productos registrados ante la FDA en los Estados Unidos para ser usados en la producción pecuaria presentan la característica de contener altos niveles de carvacrol, sin embargo con este estudio se evidenció la importancia de otros compuestos tales como el timol. Dicho compuesto podría ser postulado para su ingreso a la FDA, incluyéndolo en sistemas de producción.

http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/FoodAdditives/ ucm191033.htm#ftnO

5. Conclusiones

- El rendimiento de obtención de AE de *Lippia origanoides* Kunth nativa del alto Patía fue afectado por el método de extracción, variando en el rango 2,56% a 3,84%, siendo valores promisorios para la producción de éstos a escala industrial
- La composición del AE de orégano de monte fue afectada por el método de extracción, siendo el timol el componente mayoritario.
- Los métodos de extracción empleados influyeron sobre la actividad antioxidante, siendo el extracto EFS 110 bar-60 °C el que presentó la mayor actividad.
- La capacidad antioxidante del extracto obtenido por EFS 110 bar-60 °C fue superior a la de las fracciones correspondientes.
- El timol presente en el AE de *L. origanoides* del Alto Patía es determinante, estadísticamente, en la actividad antioxidante (DPPH y BET). Por otra parte, el acetato de timilo afecta la actividad antioxidante por BET, el α-humuleno afecta la actividad por DPPH y el trans-β-cariofileno afecta FRAP y ORAC.
- El proceso de beneficio de la especie estudiada puede dar paso a aditivos funcionales propios de sistemas de alimentación pecuaria.
- El AEO puede ser utilizado satisfactoriamente en huevos enriquecidos con omega 3, debido a que mejora la estabilidad oxidativa de la yema a una temperatura de almacenamiento de 4 °C por un período largo de tiempo.
- Los resultados obtenidos en el ensayo "*in vivo*" muestran el potencial de uso del AEO como antioxidante natural en sistemas de alimentación de ponedoras, dado que la inclusión de un estabilizante natural en productos enriquecidos con fuentes de ácidos grasos poliinsaturados, abre nuevas posibilidades para el AEO.
- Los resultados de esta investigación indican que el orégano de monte del Alto Patía es un nicho ecológico particular, ya que presenta un alto contenido de timol y una promisoria capacidad antioxidante.

6. Recomendaciones

- ☐ Se recomienda hacer la evaluación de costos de los diferentes métodos de extracción a escala piloto para proyectar su escalamiento a nivel industrial.
- ☐ Hay una necesidad de realizar estudios de sinergismo y/o antagonismo de los compuestos.
- ☐ Evaluar la actividad antioxidante de los extractos y las fracciones utilizando otras metodologías "*in vivo*".
- ☐ Sería interesante evaluar el potencial antioxidante de los extractos obtenidos por EFS, en un sistema de alimentación pecuario.
- ☐ Es necesario investigar el efecto antioxidante de los AEO sobre la yema de huevo en función del tiempo, de tal forma que se logre la identificación integral del efecto en condiciones de almacenamiento.
- ☐ Determinar en forma especifica el nivel de transferencia de los compuestos antioxidantes incluidos en la dieta a la yema de huevo.

7. Producción académica

Posters

- Vásquez, D.; Mayorga, O.; Parada, F.; Restrepo L.P.; Ariza, C. *Lippia origanoides* a natural thymol source. 10th International Symposium on Supercritical Fluids-ISSF 2012. San Francisco, CA, Estados Unidos de América. Mayo de 2012.
- Cuadros, R.; Vásquez, D.; Mayorga, O.; Toro, I.; Afanador, G.; Ariza, C. Efeito do Óleo essencial de orégano sobre a produtividade de poedeiras e a oxidação lipídica da gema de ovo. 48a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia Belém - PA. Julio de 2011.
- Vásquez, D.; Mayorga, O.; Rodriguez, D.; Afanador, G.; Ariza, C. Efecto de la suplementación de diferentes relaciones carvacrol:timol de aceites esenciales de orégano (AEO) sobre la oxidación lipídica de filetes de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*). IV Congreso Internacional de Plantas Medicinales y Aromáticas con énfasis en cosmética natural. Palmira. 2010.

Cartillas

- Rodríguez, D.; Afanador, G.; Ariza, C.; Mayorga, O.; Vásquez, D.; Núñez, M.; Jiménez, H. Uso de aceites esenciales de orégano como aditivo funcional en sistemas de producción de Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Marzo de 2011.
- Afanador, G.; Ariza, C.; Avellaneda, Y.; Rodríguez, D.; Vásquez, D. Aceites esenciales de orégano: Un aditivo funcional con amplio potencial de uso en la industria avícola. Capitulo 6. Aceite esencial de orégano como antioxidante natural para conservar los productos de la cadena avícola. Marzo de 2011.

Manuscrito

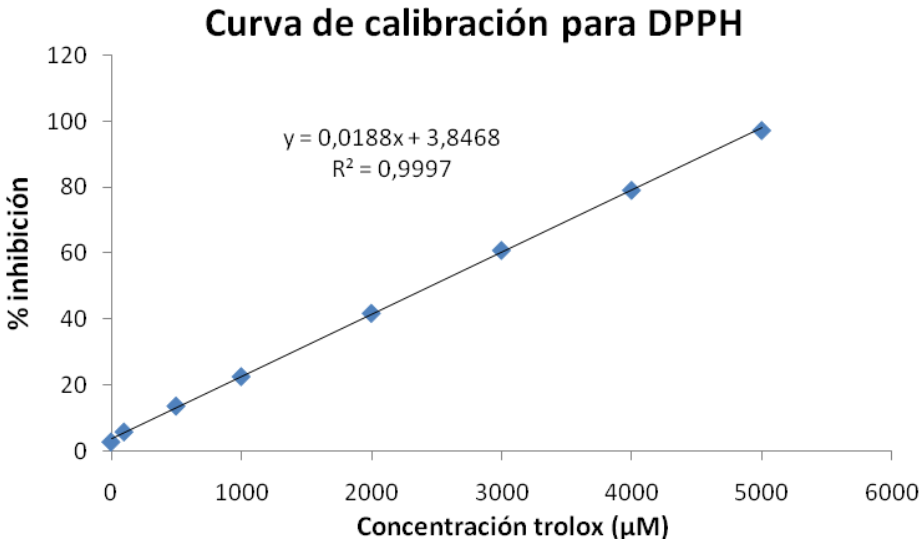
- Vásquez, D.; Mayorga, O.; Parada, F.; Restrepo L.P.; Stashenko, E.; Ariza, C. Composición química y actividad antioxidante de extractos de *L. origanoides* silvestre procedente del Alto Patía. Manuscrito en preparación.

A. Anexo: Curvas de calibración para cada uno de los métodos por los que se determina la actividad antioxidante y el CTF

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	CURVA DE CALIBRACIÓN	
DPPH	Y= 0,0188 x + 3,8468	R^2= 0,999
FRAP	Y= 0,0219 x + 0,0357	R^2= 0,996
ORAC	Y= 0,8889 x + 3,0096	R^2= 0,989
β-CAROTENO	Y= 1,7394 x + 8,7542	R^2= 0,996
FOLIN CIOCALTEU	Y= 0,0066 x - 0,0096	R^2= 0,998

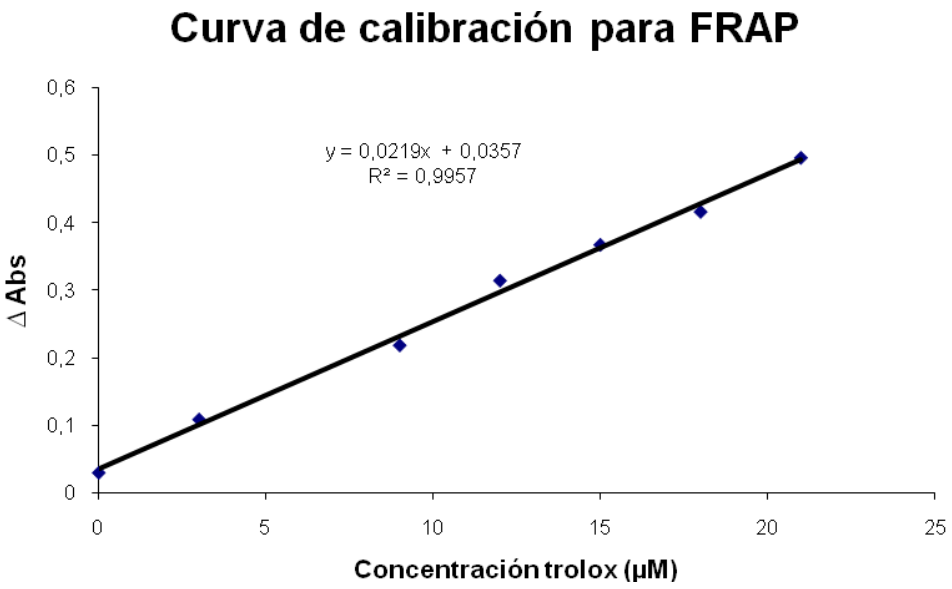
Determinación de la actividad antioxidante por el método de atrapamiento de radicales 2,2'- difenil-1- picrilhidrazil (DPPH)

Datos curva de calibración para DPPH	
Concentración Trolox (μM)	% inhibición (515 nm)
0	2,82
100	5,87
500	13,71
1000	22,65
2000	41,85
3000	60,92
4000	79,14
5000	97,28



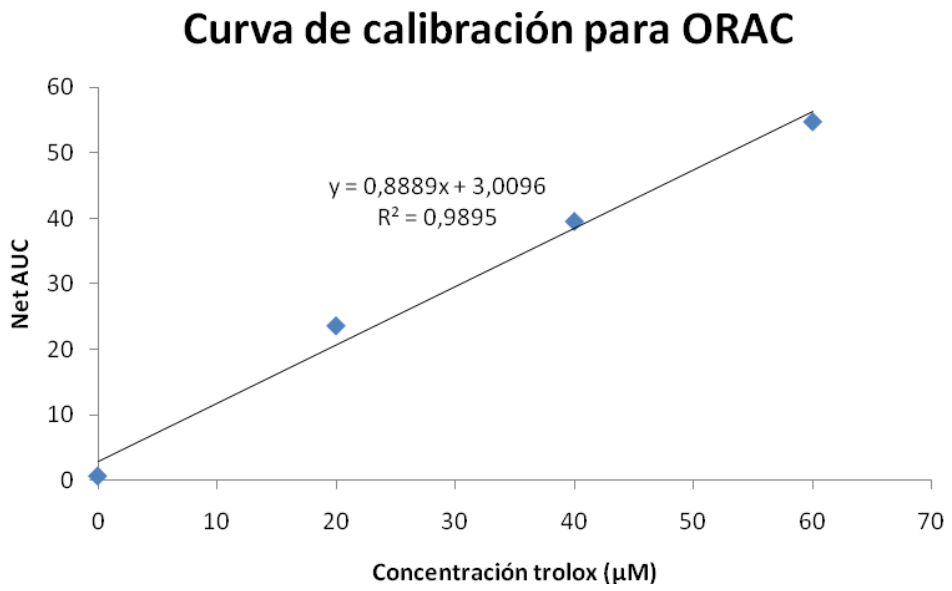
Determinación de la actividad antioxidante FRAP

Datos curva de calibración para FRAP	
Concentración Trolox (µM)	Δ Abs (593 nm)
0	0,03
3	0,109
9	0,219
12	0,315
15	0,368
18	0,417
21	0,497



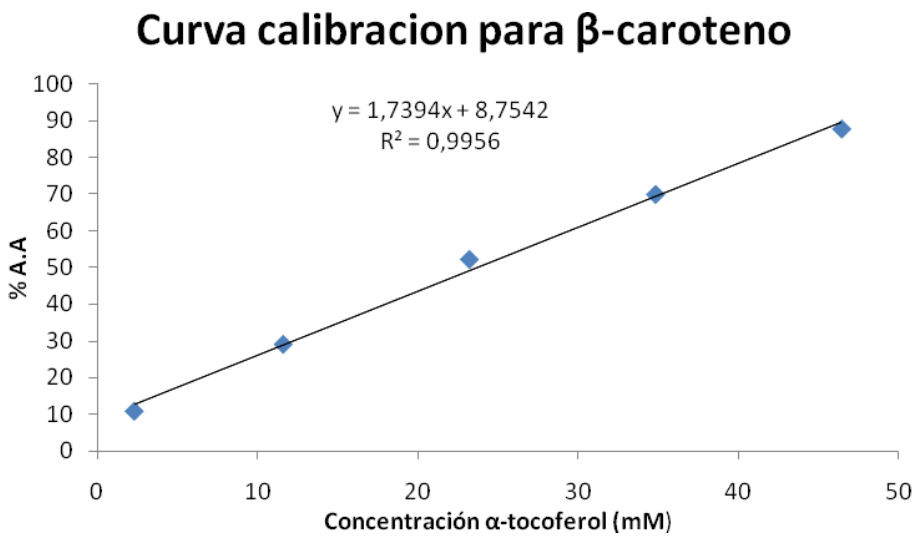
Determinación de la actividad antioxidante ORAC

Datos curva de calibración para ORAC	
Concentración Trolox (µM)	Net AUC (λ excitación = 485 nm y λ emisión = 520nm)
0	0,77
20	23,65
40	39,55
60	54,74



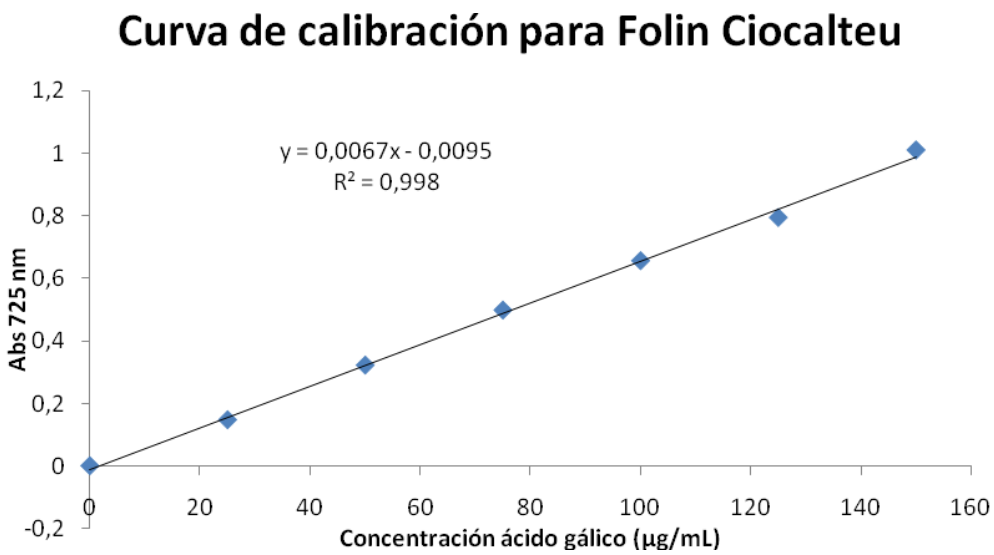
Determinación de la actividad antioxidante β-caroteno

Datos curva de calibración para β-caroteno	
Concentración α-tocoferol (mM)	% AA (470 nm)
2,32	10,9
11,61	29,1
23,22	52,2
34,83	69,9
46,44	87,6



Determinación del contenido total de fenoles

Datos curva de calibración Fenoles totales	
Concentración Acido Gálico (µg/mL)	Abs 725 nm
0	0,000
25	0,147
50	0,322
75	0,498
100	0,656
125	0,794
150	1,010


Curva de calibración para Folin Ciocalteu
y = 0,0067x - 0,0095
R² = 0,998
Abs 725 nm
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
-0,2
0
20
40
60
80
100
120
140
160
Concentración ácido gálico (µg/mL)

B. Anexo: (Ver carpeta adicional)

Bibliografía

.V. Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol. *Scientia Techn.* 2007. 33: 125-128.

Adam, K.; Sivropoulou, A.; Kokkini, S.; Lanaras, T.; Arsenakis, M. Antifungal activities of *Origanum vulgare* ssp. *Hirtum, Mentha spicata, Lavandula angustifolia,* and *Salvia fructicosa* essential oils against human pathogenic fungi. *J. Agri. Food Chem*. 1998. 46:1739-1745.

Adams, R. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4 ed. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation. 2007**.** 804 p.

Aeschbach, R.; Löliger, J.; Scott, B.C.; Murcia, A.; Butler, J.; Halliwell, B; Aruoma, O. I. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food Chem. Toxicol*. 1994. 32: 31-36.

Andre, C.M.; Ghislain, M.; Bertin, P.; Oufir, M.; Herrera, M.R.; Hoffmann, L.; Hausman, J.F.; Larondelle, Yvan.; Evers, D. Andean potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) as a source of antioxidant and mineral micronutrients. *J. Agric. Food Chem*. 2007. 55: 366-378.

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

Arabshahi, S.; Urooj, A. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food Chem*. 2007. 102: 1233-1240.

Arana, M.; Estarrón, E.N.; Obledo, E.; Padilla, C.; Silva, R.; Cervantes, L. Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* H.B.K) with different composition when microencapsulated in β-cyclodextrin. *Lett. Appl. Microbiol.* 2010. 50: 585-590.

Araya, H.; Clavijo, C.; Herrera, C. Capacidad antioxidante de frutas y verduras cultivados en Chile. *Arch. Latin. Nutr*. 2006. 56: 361-365.

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.

Arnao, M.B.; Cano, A.; Acosta, M. The hydriphilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chem*. 2001. 73: 239-244.

Aruoma, O.I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mut. Res*. 2003. 523: 9-20.

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.

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

Baratta, M.T.; Dorman H, J.D.; Deans, S.J.; Figueiredo, A.C.; Barroso, J.G.; Ruberto, G. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flav. Frag. J*. 1998b. 13: 235-244.

Bauer, K.; Garbe, D. y Surburg, H. Common fragance and flavor materiales: preparation and uses. 2001. Wiley 305 p.

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.

Benzie, I.F.; Strain, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem*. 1996. 239: 70-76.

Blanco, M.; Rodríguez, L.; Melgarejo, L.M. Composición y rendimiento del aceite esencial de *Lippia origanoides* (Verbenaceae) en el cañón del Chicamocha, Santander. Segundo Congreso Internacional de Plantas Medicinales y Aromáticas. Universidad Nacional De Colombia, Sede Palmira. 2006.

Bompadre, S.; Leone, L.; Politi, A.; Battino, M. Improved FIA-ABTS method for antioxidant capacity determination in different biological samples. *Free Rad. Res*. 2004. 38: 831-838.

Botsoglou, N.; Fletouris, D.; Papageorgiou, G; Vassilopoulos, V; Mantis, A.; Trakatellis, A. Rapid, sensitive, and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food and feedstuff samples. *J. Agric. Food Chem.* 1994. 42: 1931-1937.

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.

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.; Christaki, E.; Fletouris, D.J.; Florou, P.; Spais, A.B. The effect of dietary oregano essential oil on lipid oxidation in raw and cooked chicken during refrigerated storage. *Meat Sci*. 2002b. 62: 259-265.

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 α-tocopheryl acetate supplementation. *Food Res. Intern*. 2003a. 36: 207-213.

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

Botsoglou, N.A.; Govaris, A.; Botsoglou, E.; Grigoropoulo, S.H.; Papageorgiou, G. Antioxidant activity of dietary oregano essential oil and α-tocopheryl acetate supplementation in long-term frozen stored turkey meat. *J. Agric. Food Chem*. 2003c. 51: 2930-2936.

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.

Braithwaite, A.; Smith, F.J. Cromatographic methods. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers. 1999. p 1-14.

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

Burdock, G.A. Fenaroli´s handbook of flavor ingredients. 5th edition. CRC Press, Boca Raton, Florida. 2005. 262 p.

Calvo, R.; Partridge, M.; Jabri, M. A comparative study of principal component analysis techniques. Department of Electrical Engineering. University of Sydney. Australia. 2006. p 1-5.

Can, K.; Buchbauer, G. Handbook of essential oils. Science, technology and applications. CRC Press. 2010. 994 p.

Castañeda, M.; Muñoz, A.; Stashenko, E. Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas. *Scientia Techn*. 2007. 33: 165-166.

Castañeda, M.L. Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas. Tesis de pregrado. Universidad Industrial de Santander. 2007. 235 p.

Castro, H.I.; Rodríguez, L.I.; Ferreira, S.; Parada, F. Extraction of phenolic fraction from guava seeds (*Psidium guajava* L.) using supercritical carbon dioxide and co-solvents. *J. Supercrit. Fluids*. 2010. 51: 319-324

Castro, H.I.; Rodríguez, L.I.; Parada, F. Guava (*Psidium guajava* L.) seed oil obtained with a homemade supercritical fluid extraction system using supercritical CO_2 and co-solvent. *J. Supercrit. Fluids*. 2011. 56: 238-242.

Celis, C.N. Estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de *Lippia alba*, *Lippia origanoides* y *Phyla (Lippia) dulcis*, especies de la familia Verbenaceae. Tesis de pregrado. Universidad Industrial de Santander. 2007. 153 p.

Connor, A.M.; Luby, J.J.; Tong, C.B.; Finn, C.E.; Hancock, J.F. Genotypic and environmental variation in antioxidant activity, total phenolic content, and anthocyanin content among blueberry cultivars. *J. Am. Soc. Hortic. Sci*. 2002. 127: 89-97.

Chew, V. Comparing treament means: A compendium. *Hortic. Sci*. 1976. 11: 348-357.

Choi, H.S.; Song, H.S.; Ukeda, H.; Sawamura, M. Radical scavenging activities of citrus essential oils and their components: Detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *J. Agric. Food Chem*. 2000. 48: 4156-4161.

Chun, S.S.; Vattem, D.A.; Lin, Y.T.; Shetty, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochem*. 2005. 40: 809-816.

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

Damasceno, E.; Silva, J; Andrade, E.; Sousa, P.; Maia, J. Antioxidant capacity and larvicidal activity of essential oil and extracts from *Lippia grandis. Braz. J. Pharm*. 2011. 21: 78-85.

Dambolena, J.S.; Zunino, M.P.; Lucini, E.I.; Olmedo, R.; Banchio, E.; Bima, P.J.; Zygadlo, J.A. Total phenolic content, radical scavenging propierties, and essential oil composition of Origanum species from different populations. *J. Agric. Food Chem*. 2010. 58: 1115-1120.

Dapkevicius, A.; Venskutonis, R.; Van Beek, T.A.; Linssen, J.P.H. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *J. Sci. Food Agric.* 1998. 77: 140-146.

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.

Deng, D.; Zhang, J; Cooney, J.M.; Skinner, M.A.; Adaim. A.; Jensen, D.J.; Stevenson, D.E. Methylated polyphenols are poor chemical antioxidants but can still effectively protect cells from hydrogen peroxide-induced citotoxicity. *FEBS Lett*. 2006. 580: 5247-5250.

Diaz, M.C.; Perez, M.S.; Cabezudo, M.D. Supercritical carbon dioxide extraction of volatiles from spices: Comparison with simultaneous distillation-extraction. *J. Chromatogr. A*. 2002. 947: 23-29.

Doane, T.; Liescheski, P.B. Analytical Supercritical Fluid Extraction for Food Applications. Chapter 5. AOCS Press. 2004.

Domínguez, X. A. Métodos de investigación fitoquímica. México D.F. Ed. Limusa. 1988. p 45-66.

Dorman, H.J.; Peltoketo, A.; Hiltunen, R.; Tikkanen, M.J. Characterization of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chem*. 2003. 83: 255-262.

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.

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.

Draper, N.; Smith, H. Applied regression analysis. Second edition. John Wiley & Sons. 1981. 709 p.

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

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.

Esquivel, F. A.; Vargas, P. Uso de aceites esenciales extraídos por medio de fluidos supercríticos para la elaboración de alimentos funcionales. *Technol. Mar*. 2007. 20: 41-50.

Eyres, G.; Marriott, P.; Dufour, J. P. The combination of gas chromatography-olfatometry and multdimensional gas chromatography for the characterisation of essential oils. *J. Chromatogr. A.* 2007. 1150: 70-77.

Fadel, H.; Marx, F.; El Sawy, A.; El Ghorab, A. Effect of extraction techniques on the chemical composition and antioxidant activity of *Eucalyptus camaldulensis* var. brevirostris leaf oils. Z. *Lebensm. Unters. Forsch. A*. 1999. 208: 212-216.

Fernandes, E.S.; Passos, G.F.; Medeiros, R.; da Cunha, F.; Ferreira, J.; Campos, M.; Pianowski, L.F.; Calixto, J.B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (−)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *Eur. J. Pharm*. 2007. 569:228–236.

Frankel, E.N.; Meyer, A.S. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J. Sci. Food Agric*. 2000. 80: 192,5-1941.

Florou-Paneri, P.; Nikolakakis, I.; Giannenas, I.; Koidis, A.; Botsoglou, E.; Dotas, V.; Mitsopoulos, I. Hen performance and egg quality as affected by dietary oregano essential oil and α-tocopheryl acetate supplementation. *Inter. J. Poult. Sci.* 2005a. 4:449-454.

Florou-Paneri, P.; Palatos, G.; Govaris, A.; Botsoglou. D.; Giannenas, I.; Ambrosiadis, I. Oregano Herb vs Oregano Essential Oil as Feed Supplements to Increase the Oxidative Stability of Turkey Meat. *Inter. J. Poult. Sci.* 2005b. 4:866-871.

Galobart, J.; Barroeta, A.C.; Baucells, M.D.; Codony, R.; Ternes, W. Effect of Dietary Supplementation with Rosemary Extract and α-Tocopheryl Acetate on Lipid Oxidation in Eggs Enriched with ω3-Fatty Acids. *Poult. Sci*. 2001. 80:460- 467.

Galobart, J.; Barroeta, A.C.; Baucells, M.D.; Guardiola, F. Oxidation in fresh and spray-dried ω3 and ω6 fatty acid enriched eggs: Vitamin E vs. Canthaxanthin. En: Proceedings of the VIII European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products. Bologna, Italy. 1999. 165-169 p.

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.

Gallino, M. Una *Verbenaceae* essenciera ricca in timolo: *Lippia origanoides* H.B.K. *Essen. Deriv. Agrum.* 1987. 57: 628-629.

Gollnisch, K.; Wald, C.; Berk, A. The use of different essential oils in the breeding of piglets. German Society for Quality Investigation. XXXVI Conference. Jena. 2001. 259-262.

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. *Food Chem*. 2008. 109: 925-930.

Grabmann, J.; Schneider, D.; Weiser, D.; Elstner, E. F. Antioxidative effects of lemon oil and its components on copper induced oxidation of low density lipoprotein. *Arzneimitt. Forsch/Drug Res*. 2001. 51: 799-805.

Grabmann, J. Terpenoids as Plant Antioxidants. *Vitam. Horm*. 2005. 72: 505-535.

Grob, R.L. Modern practice of gas chromatography. New York: John Willey & Sons. 1995. p 1-44.

Güenther, E. The Essential Oils. History origin in plants production analysis. Litton Educational. New York. 1948. p 241-244.

Gutiérrez, D.M.; Ortiz, C.A.; Mendoza, A. Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal. Simposio de Metrología. Santiago de Querétaro, México. 2008.

Hernández, M.A.; Castro, H.I.; Parada, F. Integrated utilization of Guava (*Psidium guajava* L.): antioxidant activity of phenolic extracts obtained from Guava seeds with Supercritical CO_2-Ethanol. *J. Braz. Chem. Soc*. 2011. 22: 2383-2390.

Hotelling, H. Analysis of complex statistical variables into principal components. *J. Educ. Psychol.* 1993. 24: 417-441.

http://biblioteca.cogcyt.gob.mx/bvic/Captura/upload/ACTIVIDAD-ANTIMICROBIANA-TESIS.pdf. Consultada el13 de noviembre de 2010.

http://cenivam.uis.edu.co/cenivam/general/documentos/Art%C3%ADculos%20Lippia%20alba%20+%20Lippia%20origanoides%20CIBIMOL_2003_2.pdf. Consultada el 14 de octubre de 2010.

http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/FoodAdditives/ ucm191033.htm#ftnO

http://info-bee.com.ar/files/docs/timol%20en%20cria.PDF

http://sisav.valledelcauca.gov.co/CADENAS_PDF/AROMATICAS/LA%20TRANSICION%20DESDE%20LO%20ETNOBOTANICO%20HACIA%20USOS%20COMERCIALES%20D.pdf. Consultada el 13 de noviembre de 2010.

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

Jimenez, M.M.; Ubera, J.L.; Luque de Castro, M.D. Comparison of continuous subcritical water extraction and hydrodistillation of marjoram essential oil. *J. Chromatogr. A*. 1999. 855: 625-632.

Kahkonen, M.P.; Hopia, A.I.; Vucrela, 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.

Kim, H.J.; Chen, F.; Wu, C.; Wang, X.; Chung, H.J.; Jin, Z. Evaluation of antioxidant activity of Australian tea tree (*Melaleuca alternafolia*) oil and its components. *J. Agric. Food Chem*. 2004. 52: 2849-2854.

Kintzios, E**.** Orégano. The genera *Origanum* and *Lippia*. Taylor & Francis. 2002. 267 p.

Kitson, F.G.; Larsen, B.S.; Mc Ewen, C.N. Gas chromatography and mass spectrometry: A practical guide. Ed. Academic Press. San Diego. 1996. p 3, 37-38.

Koleva, I.I.; Van Beek, T.A.; Linssen, J.P.; De Groot, A.; Evstatieva, L.N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phyt. Anal*. 2002. 13: 8-17.

Kováts, E. Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. *Advan. Chromatogr.* 1965. 1: 229-247.

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.

Kruk, I.; Michalska, T.; Lichszteld, K. The effect of thymol and its derivates on reactions generating reactive oxygen species. *Chemosphere*. 2000. 41: 1059-1064.

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.

Lawrence, B.M. Essential Olis 1976-1978. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation. 1978. p 8-23.

Lecona, S.; Loarca, F.G.; Arcila, C.; Díaz, C.; Ocampo, R. Nutraceutical potential of Mexican oregano (*Lippia graveolens* K). IFT Annual Meeting, 2003. 14E-28.

Lee, S.; Najiah, M.; Wendy, W.; Nadirah, M. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Syzygium aromaticum* flower bud (Clove) against fish systemic bacteria isolated from aquaculture sites. *Front. Agric. China*. 2009. 3: 332-336.

Lemanska, K.; Szymusiak, H.; Tyrakowska, B.; Zielinski, R.; Soffers, A.E.; Rietjens. I.M. The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Rad. Biol. Med*. 2001. 31: 869-81.

Li, H.; Wong, C.; Cheng, K.; Chen, F. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT*. 2008. 41: 385-390.

Lucchesi, M.E.; Chemat, F.; Smadja, J. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *J. Chromatogr. A*. 2004. 1043: 323-327

Luque de Castro, M.D.; Jimenez, M.M.; Fernandez, V. Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants. *Trends Anal. Chem*. 1999. 18: 708-716.

Luque de Castro, M.D.; Valcárcel, M.; Tena, M.T. Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico. Editorial Reverté, S.A. 1993. 469 p.

Mantle, D.; Anderton, J.G.; Falkous, G.; Barnes, M.; Jones, P.; Perry, E. K. Comparison of method for determination of total antioxidant status: Application to analysis of medicinal plant essential oils. *Comp. Biochem. Physiol. B*. 1998. 121: 385-391.

Marcincak, S.; Cabadaj, R.; Popelka, P.; Soltysova, L. Antioxidative effect of orégano supplemented to broilers on oxidative stability of poultry meat. *Slov. Vet. Med*. 2008. 45: 61-66.

Marriott, P.J.; Shellie, R.; Cornwell, C. Gas Chromatographic Technologies for the Analysis of Essential Oils. *J. Chromatogr. A*. 2001. 936: 1-22.

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

Martínez, M.; Jiménez, A.M.; Ruggieri, S.; Frega, N.; Strabbioli, R.; Murcia, M.A. Antioxidant properties of Mediterranean spices compared with common food additives. *J. Food Protect*. 2001. 64: 1412-1419.

Mastelic,J.; Politeo, O.; Jerkovic, I.; Radosevic, N. Composition and antimicrobial activity of *Helichrysum italicum* essential oil and its terpene and terpenoid fractions. *Chem. Nat. Comp*. 2005. 41: 35-40.

McGimpsey, J.A.; Douglas, M.H.; Van Klink, J.L.; Beauregard, D.A.; Perry, N.B. Seasonal variation in essential oil yield and composition from naturalized *Thymus vulgaris* L. in New Zealand. *Flav. Frag. J*. 1994. 9: 347-352.

McNair, H.; Miller, J. M. Basic gas chromatography. New York. John Willey & Sons. 1998. p 1-9.

Meluzzi, A.; Sirri, F.; Manfreda, G.; Tallarico, N.; Franchini, A. Effects of Dietary Vitamin E on the Quality of Table Eggs Enriched with n-3 Long Chain Fatty Acids. *Poult. Sci*. 2000. 79:539-545.

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.

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.

Miller, J. N.; Miller, J.M. Estadística y quimiometría para química analítica. Pearson Prentice Hall. Madrid. 2002. p 237-239.

Moldao, M.; Palabra, A.; Beirao da Costa, M.; Bernardo Gil, M. Supercritical CO_2 extraction of *Thymus zygis* L. subsp. sylvestris aroma. *J. Supercrit. Fluids*. 2000. 18: 25-34.

Moller, S.J.; Lindberg, M.H.; Aaltonen, T.; Skibsted, L.H. Dittany (*Origanum dictamnus*) as a source of water-extractable antioxidants. *Food Chem*. 1999. 64: 215-219.

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

Morais, A.; Mourão, J. C.; Gottlieb, O. Óleos essenciais da Amazonia contendo timol. *Acta Amaz*. 1972. 2: 45-46.

Moure, A.; Cruz, J.M.; Franco, D.; Dominguez, J.M.; Nuñez, M.J.; Parajó, J.C. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem*. 2001. 72: 145-171.

Muchuwetti, M.; Nyamukonda, L.; Chagonda, L.S.; Ndhlala, A.R.; Mupure, C.; Benhura, M. Total phenolic content and antioxidant activity in selected medicinal plants of Zimbabwe. *Inter. J. Food Sci. Tech*. 2006. 41: 33-38.

Mukhopadhyay M. Natural extracts using supercritical carbon dioxide. CRC Press. U.S.A. 2000.

Nada, Babovic. Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidant fractions from selected Lamiaceae herbs and their antioxidant capacity. *Innov. Food Sci. Emer. Technol*. 2010. 11: 98-107.

Oliveira, D.N.; Leitao, G.G.; Bizzo, H.R.; Lopes, D.; Alviano, C.S.; Alviano, D.S.; Leitao, S.G. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. *Food Chem.* 2007. 101: 236-240.

Ou, B.; Huang, D.; Hampsch, M.; Flanagan, J. A.; Deemer, E. K. Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. *J. 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.

Papageorgiou, G.; Botsoglou, N.A.; Govaris, A.; Giannenas, I.; Iliadis, S.; Botsoglou, E. Effect of dietary oregano oil and α-tocopheryl acetate on iron-induced lipid oxidation of turkey meat breast, thigh, liver and heart tissues. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr*. 2003. 87: 324-332.

Parejo, I.; Viladomat, F.; Bastida, J.; Rosas, A.; Flerlage, N.; Burillo, J. Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and non-distilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *J. Agric. Food Chem*. 2002. 50: 6882-6890.

Pascual, M.E.; Slowing, K.; Carretero, E.; Sanchez, D.; Villar, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *J. Ethnoph*. 2001a. 76: 201-214.

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

Pengelly, A. The constituents of medicinal plants. An introduction to the chemistry and therapeutics of herbal medicine. Allen & Unwin. 2004. 185 p.

Pokorny, J.; Yanishlieva, N.; Gordon, M. Antioxidantes de los alimentos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. 2001. 364 p.

Pollien, P.; Ott, A.; Fay, L.B.; Maignial, L.; Chaintreau, A. Simultaneous distillation-extraction: preparative recovery of volatiles under mild conditions in batch or continuous operations. *Flav. Frag. J*. 1998. 13: 413-416.

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.

Prakash, V.; Pankaj, K.; Meenakshi, M. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant. *J. Med. Plants Res*. 2009. 3: 608-612.

Prior, R.L.; Hoang, H.; Gu, L.; Wu, X.; Bacchiocca, M.; Howard, L.; Hampsch, M.; Huang, D.; Ou, B.; Jacob, R. Assay for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity ($ORAC_{FL}$) plasma and other biological and food samples. *J. Agric. Food Chem*. 2003. 51: 3273-3279.

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.

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

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

Ribeiro, M.; Bernardo, M.; Esquivel, M. *Melissa officinalis*, L.: study of antioxidant activity in supercritical residues. *J. Supercrit. Fluids*. 2001. 21: 51-60.

Rice, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med*. 1996. 20: 933-956.

Rice, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant. Sci*. 1997. 2: 151-159.

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.

Rojas, J.; Morales, A.; Marquez, A.; Rondon, M.; Veres, K.; Mathe, I. Comparative study of the chemical composition of the essential oil of *Lippia oreganoides* collected in two different season in Venezuela. *Nat. Prod. Commun.* 2006. 1*:* 205-207.

Ruiz, C.; Tunarosa, F.; Martínez, J.; Stashenko, E. Estudio comparativo por GC-MS de metabolitos secundarios volátiles de dos quimiotipos de *Lippia origanoides* H.B.K, obtenidos por diferentes técnicas de extracción. *Scientia Techn.* 2007. 33: 325-328.

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

Sacchetti, G.; Maietti, S.; Muzzoli, M.; Scaglianti, M.; Manfredini, S.; Radice, M.; Bruni, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem*. 2005. 91: 621-632.

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.

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

Schauss, A.G.; Wu, X.; Prıor, 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.

Schlesier, K.; Harwat, M.; Bohm, V.; Bitsch, R. Assessment of antioxidant by using different in vitro methods. *Free Rad. Res*. 2002. 36: 177-187.

Schwarz, K.; Ernst, H.; Ternes, W. Evaluation of antioxidant constituents of thyme. *J. Sci. Food Agric*. 1996. 70: 217-223.

Shahidi, F.; Wanasundara, U.N.; Amarowicz, R. Natural antioxidants from low-pugency mustard flour. *Food Res. Int*. 1994. 27: 489-493.

Shahidi, F.; Janitha, P.K.; Wanasundara, P.D. Phenolic Antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. 1992. 32: 67-103.

Shimizu, Y.; Arai, K.; Ise, S.; Shimasaki, H. Dietary Fish Oil for Hens Affects the Fatty Acid Composition of Egg Yolk Phospholipids and Gives a Valuable Food with an Ideal Balance of n-6 and n-3 Essential Fatty Acids for Human Nutrition. *J. Oleo Sci*. 2001. 50: 797- 803.

Shui, G.; Leong, L. P. Residue from star fruit as valuable source for functional food ingresients and antioxidant nutraceuticals. *Food Chem*. 2006. *97*: 277-284.

Siddhuraju, P.; Mohan, P.S.; Becker, K. Studies on the antioxidant activity of Indian Laburnum (*Cassia fistula* L.): a preliminary assessment of crude extracts from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp. *Food Chem*. 2002. 79: 61-67.

Siquet, C.; Paiva Martins, F.; Lima, J.L.; Reis, S.; Borges, F. Antioxidant profile of dihydroxy-and trihydroxyphenolic acids- A structure-activity relationship study. *Free Rad. Res*. 2006. 40: 433-442.

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.; Jaramillo, B.; Martínez, J. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its *in vitro* antioxidant activity. *J. Chromatogr. A.* 2004. 1025: 93-103.

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

Suárez, A.R.; Martínez, F.O.; Castillo, G.A.; Chacón, M.I. Molecular characterization of aromatic species of the genus *Lippia* from the Colombian neotropics. *Acta Hortic.* (ISHS). 2007. 756: 129-138.

Terblanché, F.C.; Kornelius, G. Essential oils constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae)-A literature review. *J. Essent. Oil Res.* 1996. 8: 471-485.

Thaipong, K.; Boonprakob, U.; Crosby, K.; Cisneros, L.; Byrne, D.H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Comp. Anal*. 2006. 19: 669-75.

Thompson, D; Moldeus, P. Citotoxicity of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene in isolated rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol*. 1988. 37: 2201-2207.

Torres, H.; Sanchez, M.; Potes, J. Composición química del aceite esencial de dos quimiotipos de *Lippia origanoides* H.B.K. en condiciones del Valle del Cauca. Universidad Nacional, Sede Palmira. 2007.

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

Velasco, A.; Perez, M.J. Volatile constituents of four *Lippia* species from Córdoba (Argentina). *J. Essent. Oil Res*. 1993. 5: 513-524.

Velioglu, Y.S.; Mazza, G.; Gao, L.; Oomah, B.D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J. Agric. Food Chem*. 1998. 46: 4113-4117.

Vicuña, G.C.; Stashenko, E.; Fuentes, J.L. Chemical composition of the Lippia origanoides essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. *Phytother*. 2010. 81: 343-349.

Villaño, D.; Fernández, M.S.; Troncoso, A.M.; García, M.C. Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro. *Anal. Chim. Acta*. 2005. 538: 391-398.

Williams, J.R.; Clifford, A.A. Methods in Biotechnology. Supercritical Fluid Methods and Protocols. Humana Press Inc., Totowa, NJ. 2000. 253 p.

Wu, X.; Beecher, G.R.; Holden, J.M.; Haytowitz, D.B.; Gebhardt, S.E.; Prior, R.L. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agric. Food Chem*. 2004. 52: 4026-37.

Yanishlieva, N.V.; Marinova, E.M.; Gordon, M.H.; Raneva, V.G. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chem*. 1999. 64: 59-66.

Youdim, K.A.; Deans, S.G. Beneficial effects of thyme oil on age related changes in the phospholipids C and C polyunsaturated fatty acids 20-22 composition of various rat tissues. *Biochim. Biophys. Act*. 1999a.1438: 140-146.

Youdim, K.A.; Deans, S.G. Dietary supplementation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil during the lifetime of the rat: its effects on the antioxidant status in liver, kidney and heart tissues. *Mech. Age. Dev*. 1999b. 109: 163-175.

Youdim, K.A.; Deans, S.G. Effect of thyme oil and thymol dietary supplementation on the antioxidant status and fatty acid composition of the ageing rat brain. *Br. J. Nutr*. 2000. 83: 87-93.

Zheng, W.; Wang, S. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric. Food Chem.* 2001. 49: 5165-5170.

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.