

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE CUENCA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA
DE LOS RECURSOS NATURALES**

*Trabajo de titulación previo a la
obtención del título en Ingeniería en
Biotecnología de los Recursos Naturales*

TRABAJO EXPERIMENTAL:

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACEITE
ESENCIAL DE ORÉGANO (*Origanum vulgare*), OBTENIDO A PARTIR DE
DOS PRETRATAMIENTOS”**

AUTORA:

CHRISTEL DENISSE SARMIENTO GONZAGA

TUTORA:

DRA. MYRIAM XIMENA MANCHENO CÁRDENAS

CUENCA - ECUADOR

2020

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo, Christel Denisse Sarmiento Gonzaga con documento de identificación N° 0705773661, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del trabajo de titulación: **“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (*Origanum vulgare*), OBTENIDO A PARTIR DE DOS PRETRATAMIENTOS”**, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: *Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autora me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento que hago entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, julio del 2020

A handwritten signature in blue ink, enclosed in a blue oval. The signature appears to read 'Christel Gonzaga'.


Christel Denisse Sarmiento Gonzaga

C.I. 0705773661

CERTIFICACIÓN

Yo, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (*Origanum vulgare*), OBTENIDO A PARTIR DE DOS PRETRATAMIENTOS”**, realizado por Christel Denisse Sarmiento Gonzaga, obteniendo el *Trabajo Experimental*, que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, julio de 2020

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'M. Ximena Mancheno Cárdenas', written in a cursive style.

Dra. Myriam Ximena Mancheno Cárdenas

C.I. 0602018160

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Yo, Christel Denisse Sarmiento Gonzaga con documento de identificación N° 0705773661, autora del trabajo de titulación: **“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (*Origanum vulgare*), OBTENIDO A PARTIR DE DOS PRETRATAMIENTOS”**, certifico que el total contenido del *Trabajo Experimental* es de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Cuenca, julio del 2020

A handwritten signature in blue ink, enclosed in a hand-drawn oval. The signature appears to read 'Christel Gonzaga'.

Christel Denisse Sarmiento Gonzaga

C.I. 0705773661

DEDICATORIA

Dedico este trabajo, con todo mi amor y cariño,

A mi hija, quien ha sido mi inspiración

La razón de mi esfuerzo y perseverancia,

Y así llegar a ser un ejemplo a seguir para ella.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a Dios,

Por darme la sabiduría y la fuerza para seguir adelante cada día;

A mi familia, Sophia y Joffre,

Por apoyarme y darme siempre su amor incondicional;

A mi madre, Liliana

Por brindarme su apoyo infinito;

A mis abuelos,

Por estar siempre a mi lado, inculcarme los valores más importantes

Y estar siempre preocupados por mi

A mis maestros, por ofrecerme sus conocimientos y experiencias,

Y guiarme durante el transcurso de mi carrera universitaria,

Especialmente a mi tutora de tesis.

A todos, muchas gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR.....	I
CERTIFICACIÓN.....	II
DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD.....	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
INDICE DE TABLAS.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
RESUMEN.....	XI
ABSTRACT.....	XII
CAPÍTULO 1.....	1
ANTECEDENTES.....	1
1.1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.2 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	2
1.3 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	3
1.4 JUSTIFICACIÓN.....	3
1.5 LIMITACIONES.....	4
1.6 OBJETIVOS.....	4
1.6.1 Objetivo General:.....	4
1.6.2 Objetivos Específicos:.....	4
1.7 HIPÓTESIS.....	5
CAPÍTULO 2.....	6
MARCO TEÓRICO.....	6
2.1 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS.....	6
2.1.1 Aceites esenciales.....	6
2.1.2. Clasificación de los aceites esenciales.....	6
2.1.3. Importancia de los aceites esenciales.....	6
2.1.4. Métodos de extracción de aceites esenciales.....	7
2.1.4.1. Extracción por hidrolización por arrastre de vapor.....	7
2.1.4.2. Hidrolización asistida por la radiación con microondas (HDM).....	8
2.1.4.3. Ultrasonido.....	8
2.1.5. Propiedades físico químicas del aceite esencial.....	9
2.1.6. Antioxidantes.....	9

2.1.7. Métodos de actividad antioxidante.....	10
2.1.7.1. Métodos DPPH – ABTS.....	10
2.2 ESTADO DEL ARTE.....	10
2.3.1. Botánica y ecología de la especie.....	18
2.3.3. Usos etnobotánicos.....	19
2.3.4. Generalidades del orégano (<i>Origanum vulgare</i> L.).....	19
2.3.5. Composición química de los aceites esenciales de orégano	20
2.3.6. Actividad biológica de los componentes del orégano	20
CAPÍTULO 3	22
MARCO METODOLÓGICO	22
3.2 Variables de estudio	22
3.3 Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	23
3.4 Técnicas de procesamiento y análisis de datos	23
3.5 Recolección de la materia prima	23
3.6 Preparación de las muestras.....	24
3.7 Extracción del aceite vegetal.....	25
3.7.1 Ultrasonido.....	25
3.7.2 Secado de la muestra	25
3.7.3 Destilación por arrastre de vapor con agua.....	26
3.7.4 Determinación de las características físico-químicas	27
3.7.4.1 Determinación de la densidad	27
3.7.4.2 Índice de refracción	28
3.7.4.3 Solubilidad en alcohol	28
3.7.4.4 Determinación del porcentaje de ácidos grasos libres	29
3.7.4.5 Determinación del índice de saponificación	29
3.7.4.6 Determinación del índice de ésteres	30
3.7.5 Caracterización cuantitativa.....	30
3.7.5.1 Cuantificación de fenoles.....	30
3.7.6 Determinación de la actividad antioxidante.....	32
3.7.7 Análisis estadístico	33
CAPÍTULO 4	34
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
4.1 Análisis de la toma de muestras y tratamiento de la muestra vegetal.....	34
4.2 Análisis del proceso de ultrasonido.....	34
4.3 Secado de la muestra	35

4.4	Proceso de destilación por arrastre de vapor con agua	36
4.5	Análisis de las características físico químicas del aceite esencial de orégano	38
4.6	Análisis cuantitativo de fenoles	40
4.7	Análisis de la actividad antioxidante del orégano	42
4.8	Análisis estadístico	47
	CAPÍTULO 5	53
	CONCLUSIONES	53
	RECOMENDACIONES	55
	Bibliografía.....	56

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Preparación de curva de calibración de los fenoles totales	31
Tabla 2. Soluciones de aceite esencial de orégano	32
Tabla 3. Mecanismos de acción del Ultrasonido	35
Tabla 4. Resultados de los rendimientos obtenidos en las extracciones de aceite de orégano en los diferentes tratamientos	37
Tabla 5. Resultados de los parámetros físico-químicos de los aceites esenciales de orégano producidos en los tratamientos.....	38
Tabla 6. Cuantificación de fenoles de los tratamientos de aceite de orégano	40
Tabla 7. Resultados obtenidos del aceite esencial con hojas frescas y sin ultrasonido	42
Tabla 8. Resultados obtenidos del aceite esencial con hojas frescas y con ultrasonido.....	43
Tabla 9. Resultados obtenidos del aceite esencial con hojas secas y sin ultrasonido.....	44
Tabla 10. Resultados obtenidos del aceite esencial de hojas secas y con ultrasonido.....	45
Tabla 11. Resultados obtenidos en la actividad antioxidante de la curva de calibración	46
Tabla 12. Resultados obtenidos en la actividad antioxidante del aceite esencial del orégano	51
Tabla 13. Análisis de subconjuntos homogéneos de la actividad antioxidante.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de dos componentes principales de aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> spp: carvacrol (a), terpineno-4-ol (b)	20
Figura 2. Tratamientos de estudio de la capacidad antioxidante del orégano	24
Figura 3. Equipo industrial de destilación por arrastre de vapor	27
Figura 4. Histograma de los rendimientos obtenidos en cada tratamiento	37
Figura 5. Histograma de cantidades de fenoles obtenidas en cada tratamiento	41
Figura 6. Curva de calibración para las concentraciones de los patrones y muestra vs la absorbancia	41
Figura 7. Curva de calibración de los resultados obtenidos de la actividad antioxidante	46
Figura 8. Histograma de cantidades de porcentaje de inhibición (actividad antioxidante) obtenidas en cada tratamiento	47
Figura 9. Gráfica de comparación de cantidad de polifenoles y el porcentaje de inhibición del aceite esencial de orégano	48
Figura 10. Gráfica de porcentaje de inhibición del aceite esencial de orégano obtenido de hojas frescas sin ultrasonido	49
Figura 11. Gráfica de porcentaje de inhibición del aceite esencial de orégano obtenido de hojas frescas con ultrasonido	49
Figura 12. Gráfica de porcentaje de inhibición del aceite esencial de orégano obtenido de hojas secas sin ultrasonido	50
Figura 13. Gráfica de porcentaje de inhibición del aceite esencial de orégano obtenido de hojas secas con ultrasonido	50
Figura 14. Gráfica de cajas de porcentaje de inhibición del aceite esencial de orégano	52

RESUMEN

En la actualidad se ha observado un creciente consumo de antioxidantes sintéticos, los cuales están relacionadas a problemas en la salud de los consumidores, las sustancias sintéticas más utilizadas en la industria alimenticia para prevenir el deterioro oxidativo han demostrado que pueden ser promotores de tumores y cáncer. El presente trabajo analiza la actividad antioxidante del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare* L.), a partir de dos pretratamientos considerando uno de ellos la aplicación de ultrasonido, en hojas frescas y secas, mediante destilación por arrastre de vapor con agua, la caracterización físico-química del aceite esencial, que comprobó la calidad del aceite. En la determinación de los rendimientos obtenidos se dedujo que el aceite extraído con hojas secas y el proceso de ultrasonido (Tratamiento 4) fue el que alcanzó elevados rendimientos de extracción. Así mismo, en los análisis de cuantificación de fenoles y actividad antioxidante del orégano, el tratamiento 4 fue el que alcanzó mayores resultados con 59,63 mgGAE*g⁻¹ y 50.77% respectivamente. Por último, en el análisis estadístico se concluye, según la Prueba de Tukey que todas las medias son iguales, e indica que no existe una diferencia significativa entre los pretratamientos aplicados a la muestra, aunque matemáticamente, el tratamiento 4 fue considerado como el mejor en la producción de cantidad de fenoles y generación de actividad antioxidante (proceso de secado, aplicación de ultrasonido y destilación por arrastre de vapor). Se recomienda, evaluar la composición química del aceite esencial obtenido mediante diferentes métodos de extracción, ya que puede variar la composición de cada aceite esencial según el solvente utilizado.

Palabras clave: Actividad antioxidante, orégano, ultrasonido, destilación, aceite esencial, fenoles.

ABSTRACT

At present, an increasing consumption of synthetic antioxidants has been observed, which are related to problems in the health of consumers. The synthetic substances most used in the food industry to prevent oxidative deterioration have shown that they can be promoters of tumors and cancer. The present work analyzes the antioxidant activity of the essential oil of oregano (*Origanum vulgare* L.), from two pre-treatments considering one of them the application of ultrasound, on fresh and dry leaves, by distillation by steam entrainment with water, characterization Physico-chemical of the essential oil, which checked the quality of the oil. In determining the yields obtained, it was deduced that the oil extracted with dry leaves and the ultrasound process (Treatment 4) was the one that achieved high extraction yields. Likewise, in the analysis of quantification of phenols and antioxidant activity of oregano, treatment 4 was the one that achieved the greatest results with 59.63 mgGAE * g⁻¹ and 50.77% respectively. Finally, in the statistical analysis, it is concluded, according to the Tukey Test that all the means are equal, and indicates that there is no significant difference between the pre-treatments applied to the sample, although mathematically, treatment 4 was considered the best in the production of quantity of phenols and generation of antioxidant activity (drying process, application of ultrasound and steam entrainment distillation). It is recommended to evaluate the chemical composition of the essential oil obtained through different extraction methods, since the composition of each essential oil can vary according to the solvent used.

Keywords: Antioxidant activity, oregano, ultrasound, distillation, essential oil, phenols.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1.1 INTRODUCCIÓN

A lo largo de los años, la industria alimenticia ha tratado de buscar una solución para evitar el deterioro oxidativo que se produce en los alimentos procesados durante la obtención del producto final, tanto como tratamientos, así como ingrediente activo, entre ellos los antioxidantes sintéticos.

Estudios realizados indican que el consumo de alimentos elaborados con antioxidantes sintéticos puede producir problemas a la salud, como algunos tipos de cáncer a causa de la acumulación en el organismo de radicales libres (Minango & Belén, 2017). Debido a ello se han desarrollado investigaciones para retornar al uso de productos naturales como alternativa de compuestos sintéticos y como fuentes de nuevos conservadores alimentarios (Bonilla et al, 2015).

Los antioxidantes están presentes en una amplia variedad de alimentos frescos al contener un alto contenido de vitamina C, vitamina E, carotenoides y compuestos fenólicos. Además de ello, los antioxidantes naturales en los alimentos, benefician a la salud, ya que protegen los componentes celulares de las sustancias reactivas al oxígeno (Arrazola, Rojano, & Díaz, 2013).

Actualmente, varias investigaciones han demostrado que los aceites esenciales de especias aromáticas, tales como el ajo, el tomillo, la pimienta, el orégano, entre otros, poseen propiedades antioxidantes. El orégano (*Origanum vulgare L*) es una planta medicinal, nativa de la región del mediterráneo, con numerosas propiedades, entre ellas, antioxidante y antimicrobiana al contener compuestos fenólicos (Irianda & Benedito, 2017).

1.2 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Durante décadas, en la industria alimenticia, se han utilizados aditivos sintéticos para conservar los alimentos. En la actualidad se ha observado un creciente consumo de estas sustancias sintéticas, las cuales están relacionadas a problemas en la salud de los consumidores. Debido a ello, la aceptación de estos alimentos ha disminuido notablemente. Las sustancias sintéticas más utilizadas en la industria alimenticia para prevenir el deterioro oxidativo han demostrado que pueden ser promotores de tumores y cáncer (Vargas, et al., 2013).

El creciente interés por reemplazar las sustancias sintéticas por sustancias naturales en los últimos años, han generado una gran cantidad de investigaciones, demostrando que los aceites esenciales de especias tales como el ajo, clavo de olor, pimienta, tomillo, romero y orégano poseen propiedades antioxidantes (Benedito, 2017).

La oxidación de grasas o enranciamiento es la causa principal del deterioro de los alimentos, además representa uno de los mayores inconvenientes en la industria alimenticia de derivados cárnicos, debido a la alta concentración de grasas insaturadas en su formulación (Lira, 2105) (Pérez y Valenzuela, 2016).

Las hojas del orégano (*Origanum vulgare* L.) se utilizan como aditivo en las comidas por la agradable distinción que les otorga. Han comprobado que el orégano tiene aceites esenciales, que permiten mejorar la salud y ser utilizado como un sustituto de los aditivos sintéticos (Benedito & Irinda, 2017).

En Ecuador el orégano es cultivado en las provincias de la Sierra y Costa, ya que es capaz de adaptarse a varios tipos de suelos y climas, crece con mayor facilidad en terrenos algo húmedos; se compone de marcos de plantación variables según las zonas y suelos, siendo la densidad óptima de plantación de unos 40.000 pies/hectáreas (Estarron, Flores, León, & Orozco, 2016).

Esta planta es considerada como un ingrediente imprescindible en la cocina por su sabor y aroma característico, es utilizado en la salsa de tomate, las verduras fritas, la carne a la brasa y, por supuesto, la pizza. Combina eficazmente con las aceitunas encurtidas y con las alcaparras. Armoniza además con los platos picantes y populares, junto con la albahaca, da el carácter a la gastronomía italiana adaptado en nuestra cocina (Abraham, Hernández, Martínez, & Pérez, 2016).

Este aceite posee un porcentaje de inhibición característico, que se le confiere al carvacrol, timol y ácidos fenólicos. Esta capacidad, ha atraído fuertemente la atención de las industrias de procesamiento de alimentos y de las compañías de pigmentos, cosméticas y farmacéuticas (Acevedo et al., 2014).

1.3 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿El pretratamiento aplicado en la muestra para la obtención de aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) tiene influencia en su actividad antioxidante?

1.4 JUSTIFICACIÓN

Las plantas medicinales tienen un potencial de compuestos bioactivos para obtener aceites esenciales y desarrollar nuevas aplicaciones (Stashenko, Martínez, ..., & 2014, n.d.). El orégano (*Origanum vulgare* L.) es una planta herbácea que contiene una esencia aromática compuesta por carvacrol en mayor parte y por timol en menor proporción, y es un antioxidante poderoso (Solís C., 2015).

Los antioxidantes y los radicales libres, han generado una serie de conocimientos, además de considerarse de gran relevancia para la prevención de reacciones oxidantes en productos farmacéuticos, alimenticios y cosméticos (Cortés, et. al., 2017). Los antioxidantes sintéticos mayormente utilizados son el Butilhidroxianisol (BHA), el Butilhidroxitolueno (BHT), Galato de Propilo (GP) y terbutilhidroquinona (TBHQ), entre otros, que en los últimos años,

su uso ha sido discutido al ser volátiles, se descomponen con facilidad a altas temperaturas y tienen un potencial efecto tóxico para la salud de los consumidores, lo que ha llevado al desarrollo de nuevas opciones para reemplazarlos por antioxidantes naturales así como la medición de su efectividad en la calidad de los productos obtenidos (Valenzuela V & Pérez M, 2016).

La aplicación de ultrasonido como pretratamiento de las muestras en la destilación por arrastre de vapor es una metodología aplicada con el fin de disminuir la degradación térmica de los compuestos y aumentar el rendimiento de la extracción (Parada, et.al., 2012).

1.5 LIMITACIONES

La presente investigación se desarrollará en los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana, sede Cuenca, en un periodo de 6 meses; las limitaciones consideradas son:

- El bajo rendimiento de la extracción del aceite esencial.
- Tiempo de seis meses para desarrollar el estudio
- Infraestructura

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo General:

- Determinar la actividad antioxidante del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) obtenido a partir de dos pretratamientos.

1.6.2 Objetivos Específicos:

- Aplicar dos pretratamientos a las muestras de orégano (*Origanum vulgare*) utilizando ultrasonido en uno de ellos, para su posterior caracterización.
- Determinar la actividad antioxidante del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) con el método DPPH, estableciendo el pretratamiento más eficiente en el estudio.

- Comparar los valores de la capacidad antioxidante de los aceites esenciales obtenidos, aplicando técnicas de análisis estadístico, determinando su posible aplicación en la industria alimenticia.

1.7 HIPÓTESIS

Si el aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) obtenido a partir de la muestra húmeda pretratada con ultrasonido tiene actividad antioxidante semejante al antioxidante sintético BHT, entonces puede ser utilizado en la industria alimenticia.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS

2.1.1 Aceites esenciales

Los aceites esenciales son sustancias que poseen una elevada volatilidad, evaporándose al contacto con el aire. Pueden ser obtenidos de diferentes partes de las plantas, ya sean hojas, tallos, semillas, raíces, etc., son considerados metabolitos secundarios y su composición difiere según el hábitat y el método de obtención (Acevedo et al., 2005; Astudillo, 2014).

2.1.2. Clasificación de los aceites esenciales

Los aceites esenciales tienen tres criterios de clasificación (consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios); según su consistencia los aceites esenciales pueden ser esencias fluidas (líquidos volátiles), bálsamos (consistencia espesa) y oleorresinas. Con características volátiles, ligero espesor y pueden ser utilizados en procesos de polimerización.

Además, los aceites esenciales sesquiterpenoides, que son ricos en sesquiterpenos (p.ej. copaiba, pino, junípero, etc.) y los fenilpropanoides ricos en fenilpropanos (p.ej. clavo, canela, anís, etc.). (Martinez, 2001).

2.1.3. Importancia de los aceites esenciales

El precio de los aceites esenciales y su uso empresarial o industrial se relacionan con estructura química y actividad biológica. En estos días, la aplicabilidad de estos aceites esenciales con porcentajes de inhibición elevados se los puede utilizar para sustituir aditivos sintéticos, debido a que permite prevenir la presencia de trastornos y enfermedades que

pueden ser provocadas por la presencia de impurezas y residuos químicos.

En la actualidad, investigaciones realizadas han comprobado que una gran cantidad de compuestos antioxidantes con tocofenoles, carotenoides y ácido ascórbico, permiten proteger a las células frente a la oxidación, que producen el envejecimiento y la constante presencia de enfermedades de glucosa, cardiovasculares y cancerígenas. Este tipo de sustancias poseen una amplia utilización en la medicina para disminuir las enfermedades que se dan por la oxidación de lípidos, razón por la cual es de importancia mantener sus características organolépticas para disminuir la formación de sustancias tóxicas (Torrenegra, 2014).

2.1.4. Métodos de extracción de aceites esenciales

Los métodos de extracción usados con mayor frecuencia son la destilación por arrastre de vapor y el uso de solventes orgánicos. La destilación por arrastre de vapor, como su nombre lo dice, usa vapor saturado a presión atmosférica para obtener el aceite esencial. La extracción se produce cuando el vapor rompe las células de las paredes de las plantas, las gotas de agua de vapor y la esencia se libera (Minango & Belén, 2017; Astudillo, 2014).

2.1.4.1. Extracción por hidrolización por arrastre de vapor

En el proceso de destilación por arrastre con vapor, los compuestos volátiles pueden quedarse en las membranas secas de las hojas, por lo que es necesario hidratar la muestra mediante vapor saturado y mantener varias condiciones que se pueden alcanzar cuando el material tiene las concentraciones de agua apropiadas, así mismo como la solubilidad y la temperatura en el proceso (Barrera & Plantas, 2013; Bejarano, Ochoa, Paredes, & Silva, 2012).

Al utilizar elevadas temperaturas y la presencia de agua permiten que sea favorable el proceso para la formación de alcoholes y ácidos al momento que se descomponen los ésteres, que provocan disminuir la extracción del aceite, siendo esta una de las desventajas de la destilación por arrastre de vapor con agua (Quispe & Taco, 2018). Cada uno de los

compuestos de los aceites no son estables a elevadas temperaturas, por lo que es necesario controlar la temperatura, la presión y el tiempo en el proceso para mejorar la composición del aceite y obtener un óptimo producto (Albarracín & Gallo, 2003).

2.1.4.2. Hidrolización asistida por la radiación con microondas (HDM)

Las microondas son aquellas radiaciones electromagnéticas que poseen una frecuencia de 0,3 a 300 GHz. Generalmente, los microondas domésticos e industriales se utilizan a 2,45 GHz para evitar interferencias con la radio comunicación (Contreras, 2010). Los campos eléctricos y magnéticos de las microondas, debido a su naturaleza, son perpendiculares entre ellos, éstos causan el calentamiento mediante dos tipos de mecanismos, la rotación bipolar y la conducción iónica (Ochoa, 2017).

La conducción iónica se da lugar al someter a un campo eléctrico de radiación a especies iónicas libres en la disolución, formando una corriente eléctrica en donde los iones intentan orientarse, que dará como resultado instantáneo el calentamiento localizado (Correa Hernández, 2011). Mientras que la rotación bipolar es debida al alineamiento en el campo eléctrico de las moléculas con un mismo momento bipolar en la muestra sólida y el disolvente. Esta oscilación produce colisiones con las moléculas circundantes y así, la liberación de la energía térmica al medio. Con una frecuencia de 2,45 GHz, este fenómeno ocurre $4,9 \times 10^9$ veces por segundo y el calor generado es muy rápido. Por lo tanto, a diferencia de los métodos conocidos de suministro de calor por conducción, las microondas dan el calentamiento a toda la muestra homogéneamente, produciendo la expansión y la ruptura de las paredes celulares, de modo que el aceite esencial se libera; por lo que el contenido de humedad juega un papel esencial al promover esta liberación de los solutos al medio circundante (Buchbauer, et al., 2005).

2.1.4.3. Ultrasonido

La aplicación de ultrasonido (EAU) se da en procesos de extracción para aislar compuestos. Con esta tecnología se intensifica la transferencia de masa y los efectos

capilares, además de la penetración del disolvente en los alimentos. Este beneficio es producido debido al fenómeno de cavitación de las paredes celulares por el colapso de las burbujas cerca de las mismas, de manera que la extracción y el porcentaje de rendimiento tienden a aumentar si se utilizan variables de ultrasonido, tales como el tiempo, la duración y la potencia (Carranza, Corona, Martínez, & Ruíz, 2016).

2.1.5. Propiedades físico químicas del aceite esencial

Los aceites esenciales son líquidos a temperatura ambiente y son volátiles, su densidad es inferior a la del agua, poseen un índice de refracción elevado y la mayoría desvían la luz polarizada, son liposolubles y solubles en disolventes orgánicos. Su composición química depende del origen botánico, del ciclo vegetal, las condiciones medio ambientales, y el método de obtención (Anzaldúa, 1994).

2.1.6. Antioxidantes

Los antioxidantes son todas las moléculas con la capacidad de retardar o prevenir la oxidación para estabilizar algún componente biológico. Existen tipos de antioxidantes que pueden ser utilizados *in situ* (endógenos) y los que se pueden ingerir mediante la dieta (exógenos) (Acevedo, Granados, & Yáñez, 2014; Crado & Moya, 2009).

Al destruirse el radical libre, el antioxidante se oxida; debido a ello se deben restaurar constantemente. Los principales mecanismos de acción son: el primero, el antioxidante primario, que dona un electrón al radical lipídico y producen derivados de lípidos y radicales antioxidantes más estables; el segundo, el antioxidante secundario, que frenan la velocidad de oxidación de distintas formas, a menudo como sinergias de antioxidantes, como ácido cítrico, ácido ascórbico, lecitina, etc (Torrenegra, 2014).

Los antioxidantes primarios comúnmente utilizados en la industria alimenticia son aquellos de síntesis química como el Hidroxianisol butilado (BHA), el Hidroxitolueno butilado (BHT), Galato de propilo (PG) y el Terbutil hidroquinona (TBHQ). Entre los

antioxidantes naturales de los alimentos son categorizados como primarios se encuentran los tocoferoles, los carotenoides y los compuestos fenólicos (Astudillo, 2014).

2.1.7. Métodos de actividad antioxidante

Los métodos para la determinación de actividad antioxidante son variados debido a la suma de las capacidades antioxidantes de cada componente y del microambiente del compuesto, siendo los más aplicados por su estabilidad frente a los efectos sinérgicos o inhibitorios que se puedan producir: el DPPH y ABTS (Herrera & Villegas, 2017; Kuskoski et al., 2005).

2.1.7.1. Métodos DPPH – ABTS

La técnica DPPH, consiste en que este radical tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por la reacción a la presencia de una sustancia antioxidante, siendo medida espectrofotométricamente a 517 nm. Por diferencia de absorbancia se determina el porcentaje de captación de radical libre DPPH a una concentración de 20 mg/L. El método ABTS se basa en la reducción de la coloración verde/azul producida por la reacción de esta sustancia con persulfato potásico incubados a temperatura ambiente y en la oscuridad por 16 horas a 754 nm (Puerta, 2002).

2.2 ESTADO DEL ARTE

Según Torrenegra (2014), en su trabajo de investigación “*Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar extraído de especie de orégano (Origanum vulgare L.), orégano "borde blanco" (Origanum vulgare ssp) y oreganito (Lippia alba mill) cultivado en la zona norte del departamento de Bolívar (Colombia)*”, tuvo como objetivo extraer, caracterizar y evaluar la capacidad antioxidante de los aceites esenciales (AE) obtenidos de las especies vegetales en tres especies de orégano en el Departamento de Bolívar (Colombia), donde determinó que los aceites esenciales producidos presentaron un porcentaje de

inhibición semejante al estándar de ácido ascórbico, siendo el de mayor capacidad antioxidante el AE de orégano de borde blanco obtenido por HDM.

La particularidad destacada del aceite esencial es la presencia de monoterpenos oxigenados, debido a que un aceite está compuesto de alcoholes, aldehídos, cetonas, éteres, etc. A nivel químico, los aceites esenciales contienen terpenos, monoterpenos, sesquiterpenos (hidrocarburos, alcoholes y cetonas, que pueden ser acíclicos, monocíclicos, bicíclicos a tricíclicos), sustancias azufradas y nitrogenadas (Benellic, Govindarajan, S, & Rajeswarya, 2016).

En la investigación de Nolazco & Tellez (2017), observaron que el aceite esencial de orégano, de la ciudad Tacna de Perú tiene características fisicoquímicas de índice de refracción de 1,475, de densidad específica de 0,9132 y de solubilidad en alcohol de 75 ml. En el análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría el aceite estaba compuesto de l-4 terpineol, 26,56; timol, 18,80; γ -terpineno, 11,77; 2-careno, 6,53; terpineol, 4,08; m-cimeno, 3,27; y carvacrol, 2,24.

Debido a la resistencia antibacteriana generada por la utilización de antibióticos promotores de crecimiento (APC) en especies de corral y la huella que causa en la salud de la población, la OMS ha propuesto su eliminación en el mercado y prohibición de su uso a nivel mundial. En el 2003, la Unión Europea estableció que a partir del 2006 los antibióticos, coccidiostatos e histomoniatos no deben ser usados en alimentos para animales (WHO, 2001; FAO, 2005). Algunos centros investigativos, como la Universidad Industrial de Santander y el Centro de Investigación de Biomoléculas, buscan sustancias de origen natural con características antioxidantes para reemplazar los a los sintéticos en exhaustivos estudios de sus propiedades fisicoquímicas y toxicológicas (Puerta, 2002).

En el trabajo realizado por Martínez, Stahenko & Tafurt (2005), investigaron las actividades antioxidantes in vitro de los aceites esenciales de orégano, cilantro y romero con emulsiones de agua en aceite (Ag/Ac) y aceite en agua (Ac/Ag), las cuales fueron experimentadas en estado oxidativo por radiación ultravioleta. Al inicio, en el proceso de

emulsión de Ag/Ac, el aceite esencial de orégano presentó una actividad antioxidante elevada a comparación de los otros dos aceites esenciales. Al final, determinaron que el porcentaje de inhibición del orégano y del cilantro se elevados en la margarina y el orégano posee una acción baja de emulsión de Ac/Ag.

Perú es uno de los países con mayor diversidad biológica del mundo, debido a su posición geográfica en el planeta. El país cuenta con 45 – 55 mil especies de plantas, de las cuales 2000 son promisorias. Debido a esta gran diversidad (fauna y flora) sus beneficios para alimentación, medicina e industria se pueden aprovechar (ADEX, 2013).

Según Tellez (2017), en su investigación se planteó como objetivo caracterizar el contenido de timol y carvacrol del aceite esencial obtenido de varios tipos orégano los cuales fueron recolectados a cinco diferentes altitudes en Urubamba, El Cusco. Los fenoles observados pertenecieron a las especies: Italiana, Oreja de Elefante, Nigra, Chino y Floración temprana 1 y 2. Esta determinación se realizó por análisis de cromatografía líquida HPLC y encontró diferencias en la concentración de componentes timol y carvacrol para todas las muestras, estableciendo diferencias significativas a pesar de pertenecer a la misma familia. Los compuestos de aceite varían según diferentes factores, entre ellos: la ubicación, el clima, la genética de la planta, etc.

De igual manera, los rendimientos y las concentraciones varían según la especie y la altitud, determinando que el timol y carvacrol son los componentes que confieren las propiedades antimicrobianas, antioxidantes y conservantes, incluso puede ser utilizados en cosmética y perfumería.

El uso de antioxidantes es una forma efectiva de reducir al mínimo o prevenir la oxidación de lípidos en productos alimenticios, retardando la formación de productos tóxicos y de esta forma mantener la calidad nutricional y lograr prolongar la vida útil. Los antioxidantes pueden actuar como quelantes de metales y limpiadores de radicales libres de oxígeno provocando un retraso en la progresión de la oxidación de los lípidos. Varios antioxidantes sintéticos han sido utilizados con éxito para prevenir la oxidación de lípidos en las carnes

tales como: nitritos, BHA, BHT y TBHQ. Sin embargo, el uso de estos antioxidantes sintéticos ha sido restringido debido a los posibles riesgos para la salud y su toxicidad. Junto a esto, con el paso del tiempo los consumidores han empezado a exigir cada vez más productos libres de aditivos o con aditivos naturales (Choi et al., 2010; Lee & Shibamoto, 2002).

En la actualidad, para productos cárnicos se usan mezclas de gran variedad de preservantes sintéticos como el lactato, diacetato y los nitritos. Sin embargo, el consumidor actual está buscando productos más naturales. Según Acón (2016), en su documento de investigación presenta la evaluación de la capacidad antioxidante y antimicrobiana del orégano en polvo (OP) y en oleoresina (OO) y de la mostaza china en polvo (MP).

Acón (2016) utilizó en primer lugar OP al 0,5% y al 1,0%, OO al 0,4% y al 0,6% y MP al 0,5% y al 1,0% como los tratamientos para evaluar la capacidad antioxidante contra un control de 156 ppm de nitrito adicionado en una matriz cárnica. Después midió el índice de peróxidos (IP) y el valor del número de TBA a los geles cárnicos cada 5 días durante 20 días y se mantuvo un control sobre su pH. En cuanto al pH y observó que no había diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos y que se mantiene constante a través del tiempo. Con el IP encontró que todos los tratamientos con orégano presentan una actividad antioxidante igual a la del control y por lo tanto presentan una alternativa prometedora para los antioxidantes sintéticos. Con respecto a la determinación del valor del número de TBA, se encontró que el OP y OO provocan un cambio de coloración amarillo en lugar de rosado y por ende este análisis no resulta adecuado para evaluar oxidación en productos con orégano ya que el pico de absorción máximo se presenta a los 450 nm y no a los 538 nm, por lo que no existe una manera de correlacionar los resultados. No obstante, al comparar los resultados de la MP y el control, se encontró que la MP al 1,0% no presenta diferencias significativas con el tratamiento control. Uniendo ambos análisis (IP y TBA), determinó que ambas especias presentan actividad antioxidante y que ambas son una potencial alternativa para los antioxidantes sintéticos.

En la evaluación de la actividad antimicrobiana, analizó OP al 1,0% y 2,0%, OO al 0,6% y 2,0% y MP al 1,0% y 2,0% en comparación con una mezcla control de 500 ppm de nitrito con 2,0% de diacetato y 4,8% de lactato con el método de concentración mínima inhibitoria (CMI) obtuvo con algunas variaciones en donde dependiendo de la densidad de crecimiento se clasifican los microorganismos en sensibles o resistentes. También observó la presencia de *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Pseudomonas spp.* y *Lactobacillus spp.* encontró que todos los microorganismos eran sensibles a los tratamientos de OP al 2,0% y al control. Luego, con los recuentos totales interpreto que el control y el OP al 2,0% poseían un efecto bactericida y no bacteriostático con diferencias significativas entre sí, en donde el tratamiento de OP es el que presenta la mayor reducción de microorganismos. Por último, al unir los resultados de la actividad antioxidante y la antimicrobiana, se puede observar cómo los tratamientos con OP son los que presentaron los mejores resultados Acón (2016).

En la actualidad varias investigaciones han determinado que algunas enfermedades están asociadas a la acumulación de radicales libre en el cuerpo y al uso de antioxidantes sintéticos, que produce la muerte celular, envejecimiento, enfermedades cardiovasculares, cataratas y cáncer; así mismo, la disminución de vitaminas (A, D, E y C), que causa al reducir la solubilidad de las proteínas, la oxidación de las vitaminas A, β -caroteno y ácido ascórbico (Anzaldúa, 1994).

Mediante la obtención de aceites esenciales de orégano, tomillo y clavo de olor y al estudiar su potencial antioxidante, se eligieron los extractos de mayor inhibición, para determinar el porcentaje de concentración antioxidante y los cambios que se pueden producir en las características organolépticas de derivados cárnicos cocidos como el salami.

Los porcentajes de antioxidantes de los extractos se determinaron mediante procesos de grado de inhibición de la peroxidación del ácido linoleico, poder de reducción y test del β - caroteno, con el objetivo de aclarar que los tratamientos con aceites esenciales en estudio tienen el potencial de reducir de forma significativa la oxidación en alimentos cárnicos cocidos (salami); los cuales se evaluaron según los análisis de actividad antibacteriana, concentración mínima inhibitoria (MIC) y antioxidante. Al final de la investigación

concluyeron que los resultados fueron positivos al emplear extracto de clavo de olor por actuar como antioxidante y conservante (Cardona & Mejia, 2009).

Una gran cantidad de enfermedades bacterianas se han logrado tratar mediante la utilización de extractos de plantas, debido a la cantidad de metabolitos secundarios que presentan y permiten mejorar los procesos metabólicos (lipófilos volátiles) del cuerpo, que pueden ser extraídos mediante procesos fáciles como la destilación de arrastre de vapor con agua o disolventes orgánicos. Aunque pocas bacterias no son sensibles a aceites esenciales, esta característica ha aumentado su importancia en la nutrición de animales rumiantes, ya que permiten mejorar los procesos de fermentación en el animal, a partir de la selección de microorganismos favorables en este proceso (Burt, 2004; Dudareva, Pichersky, & Gershenzon, 2004).

Según Buñuelos et al., (2007), las plantas contienen compuestos como: el timol, el carvacrol, el limoneno, el linalol y el terpineno, que pueden ser encontrados en extractos de *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare* L., *Artemisa ludoviciana* y *Ruta graveolens*, y pueden ser utilizados como un agente antimicrobiano frente a *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomona sp* y *Staphylococcus aureus*.

Los aceites esenciales los obtuvieron mediante el proceso de destilación simple empleando alcohol etílico como solvente y el análisis de la composición de los extractos los realizó mediante cromatografía de gases. Para la determinación de la actividad antimicrobiana se usó la técnica de difusión en pozo y disco, demostraron que bacterias presentan diferentes niveles de sensibilidad obteniendo incrementos de concentración de crecimiento *S. aureus* con el extracto de *O. vulgare* y *R. graveolens*, mientras que la bacteria *Pseudomona sp*, con los extractos de *A. ludoviciana*, *L. tridentata* y *O. vulgare*.

De acuerdo con los resultados finales, de las cuatro plantas evaluadas, el extracto de *L. tridentata* fue mejor, debido a que presentó la mayor inhibición en comparación con los otros extractos y con un efecto similar a los aceites empleados como control. Por último, observó

que los efectos inhibitorios de los extractos y los aceites sobre cada una de las bacterias fueron mejores en el proceso de difusión de disco.

En la investigación de Acevedo. et al. (2014), se determinaron los componentes químicos y la capacidad antioxidante del aceite esencial de *Myrcianthes leucoxyla* (arrayán), conseguido en Colombia en el departamento del Norte de Santander. La obtención del aceite se realizó mediante el procedimiento de arrastre de vapor, el análisis de sus componentes químicos la realizó con el método de cromatografía de gases de alta resolución y la determinación de la actividad antioxidante la ejecutó por atrapamiento del catión radical ABTS⁺ y por el radical DPPH. Los resultados que obtuvieron de la inhibición con el radical DPPH no supero el 15%, aunque con el radical ABTS obtuvieron datos finales superiores. Esto indico que los extractos obtenidos tienen compuestos donadores de hidrogeno o electrones que permiten estabilizar el radical catiónico ABTS.

Luego de que se determinara la actividad antioxidante del aceite esencial del arrayan se logró extender el estudio de su aplicación en la industria alimenticia como una alternativa de los antioxidantes sintéticos. En estudios realizados por varios científicos confirman que las alteraciones o daños del AND por radicales libres podrían causar efectos nocivos y acelerarían a la formación de mutaciones y carcinogénesis (Crado & Moya, 2009).

Existen una gran cantidad de componentes químicos con la función de neutralizar la propiedad perjudicial de los radicales libres que pueden tener los alimentos comunes (frutas y verduras), que tienen un elevado contenido de moléculas antioxidantes (Asuero, Fett, Kuskoski, Mancini, & Troncoso, 2005).

En el estudio experimental de Chasipanta & Chicaiza (2016), se analizó el potencial antioxidante de cinco especies en Kutuku de la Universidad Politécnica Salesiana (*Ocotea quixos*; *Psidium guajava*; *Eugenia stipitata*; *Piper auritum* y *Piper imperiale*), que son utilizadas por los habitantes como suplementos medicinales.

A partir de métodos espectrofotométricos (DPPH y ABTS) se cuantificó la posibilidad de captar radicales libres de los aceites, en el cual se determinó que *Piper imperiale* tenía mayor capacidad de capturar a los radicales. Mientras que para el análisis de la actividad antioxidante la utilizaron el proceso del blanqueo del β -caroteno, páralo cual *P. imperiale* fue el extracto que contenía mayor porcentaje de actividad de oxidación.

El orégano (*Origanum vulgare* L.) es muy reconocido a nivel mundial debido a sus características organolépticas, existen otros géneros como *Origanum majorana* L. y *O. vulgare* L que son muy reconocidos en Europa, además tiene sus híbridos *O. x majoricum* y *O. x applii*. Cada una de estas especies tienen varias funcionalidades que pueden ser utilizadas en la industria alimentaria, farmacéutica y perfumería (Fugelsang, Gump, Nury, & Zoeklein, 2001).

Enfermedades como el asma, la indigestión, migrañas y reumatismo pueden ser tratadas al utilizar el orégano, además tienen propiedades desinfectantes. El orégano tiene propiedades antioxidantes y conservantes, convirtiéndole en un componente importante en la industria alimenticia e incrementando su importancia en investigaciones. Los componentes principales del orégano son los polifenoles, debido a que permiten el grado de hidroxilación y la posición de los oxhidrilos (Rouquaud & Videla, 2000).

En el trabajo de investigación de Amadio et al., (2011), utilizaron el aceite extraído por arrastre por vapor de orégano criollo y mendocino, provenientes de Mendoza-Argentina, para determinar actividad antioxidante y conservante en alimentos, se analizó el rendimiento, cantidad de polifenoles totales, se cuantificó el timol y el carvacrol por HPTLC y DPPH.

La funcionalidad como conservante la evaluaron en el laboratorio, en difusión en agar con cinco cultivos de bacterias patógenas y seis cepas de bacterias lácticas que alteran los alimentos. En el análisis de los porcentajes de rendimientos obtuvieron resultados favorables y elevados con relación a otros estudios de la misma especie, mientras en la evaluación de la cantidad de polifenoles determinaron que el timol prevalecía sobre el carvacrol.

El empleo de varios aditivos y suplementos en la ganadería, como antibióticos, coccidiostatos e histomoniatos, han sido restringidos por el abuso de manejo en el crecimiento de los animales que ponen en riesgo la salud humana, por la proliferación de microorganismos patógenos (Wallace, 2004; Castanon, 2007).

También han permitido observar que los aceites esenciales mejoran la conversión alimenticia, estimulando enzimas digestivas y mejorando el sabor de los alimentos (Herrea, y otros, 2015). Además, han analizado que los mismos están formados por líquidos aromáticos que se encuentran en diferentes partes de la planta, no obstante, investigaciones muestran que algunos aceites poseen actividades antibacteriana, antifúngica, antiviral, insecticida y antitóxica (Cakir, y otros, 2005).

2.3 BASES TEÓRICAS

2.3.1. Botánica y ecología de la especie

Origanum vulgare L. (Orégano), es una planta herbácea perteneciente a la familia Labiaceae. La planta forma un arbusto de 45 cm de alto, sus tallos tienen una tonalidad rojiza y ramificada en la parte superior y deshojada en la parte inferior. Poseen flores muy pequeñas de color blanco o rosa que se desprenden de las inflorescencias terminales. Sus hojas son ovales y anchas (2-5 cm) con bordes ligeramente dentados y con vellosidades en su envés; son utilizadas en recetas culinarias como condimento tanto secas como frescas (Barrera & Plantas, 2013; Acevedo et al., 2005).

2.3.2. Estudios químicos de la planta

Acevedo (2005) indica que los principales componentes químicos del aceite esencial de orégano son: Timol como mayoritario, seguido por p-Cimeno, γ -Terpineno, cariofileno, óxido de cariofileno, trans-Bergamoteno, Eugenol y Bergamoteno, representando más del 80% registrado.

Solís (2012), determinó los potenciales bioconservadores en pollo revelando que el orégano está compuesto por: apigenina, luteolina, agliconas, alcoholes alifáticos, compuestos terpénicos y derivados del fenilpropano, además de ácidos tales como: coumérico, ferúlico, caféico, r-hidroxibenzoico y vainillínico. Mientras que la capacidad antioxidante y antimicrobiana del orégano se atribuye a compuestos fenólicos como el timol, el carvacrol y ácidos fenólicos (Benedito & Irianda, 2017).

2.3.3. Usos etnobotánicos

El uso principal del orégano es como condimento en una gran cantidad de recetas culinarias, además se usa como aromatizante en licores, salsa de tomate, aderezos de ensaladas, productos horneados como la pizza y panes. Su uso como planta medicinal es variado, entre ellos se destacan sus propiedades antiespasmódicas, estimulantes, expectorantes, estomáticas, diuréticas, antisépticas y cicatrizantes; en el área de la cosmética se usa en formulaciones de perfumes y jabones (Asencio, 2013).

En la industria alimenticia el uso de aceites esenciales es de gran importancia ya que es considerado seguro en alimentos, sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes pueden actuar como conservantes al alargar su vida útil e inhibir el crecimiento de microorganismos (Asencio, 2013; Benedito & Irianda, 2017).

2.3.4. Generalidades del orégano (*Origanum vulgare* L.)

Pertenece a la familia Lamiaceae, el nombre del orégano proviene del griego *oros* y *gamos*, que significa adorno o alegría de la montaña, hace referencia al aspecto y aroma agradable de esta planta que se empleaba en la antigüedad como aperitivo amargo, tónico y desinfectante de heridas. La denominación de la especie *vulgare* indica la asiduidad de su presencia en los lugares de origen.

La característica más importante es su potencial antioxidante y antimicrobiana frente a bacterias patógenas como: *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus*

aureus, *Staphylococcus epidermidis*, entre otros, además, esta planta favorece la inocuidad y estabilidad de los alimentos como también protegerlos contra alteraciones lipídicas (Arcila, Gonzáñez, Loarca, & Lecona, 2004).

2.3.5. Composición química de los aceites esenciales de orégano

La composición química de los aceites esenciales son: terpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, (así como éstos pueden ser acíclicos, monocíclicos, bicíclicos a tricíclicos), además de sustancias azufradas y nitrogenadas (Novelazco & Tellez, 2017).

Los compuestos reportados en estudios previos por Benellic, Govindarajan & Rajeswarya (2016), destacan al carvacrol (38,30 %), y al terpineno-4-ol (28,70 %), cuyas estructuras químicas se pueden observar a continuación.

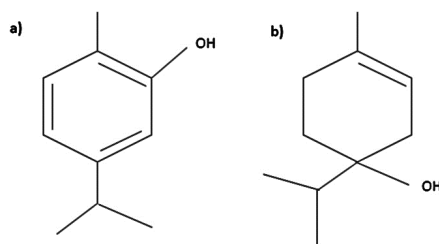


Figura 1. Estructura química de: carvacrol (a), terpineno-4-ol (b)
Fuente: Novelazco & Tellez (2017).

2.3.6. Actividad biológica de los componentes del orégano

El aceite esencial de orégano posee actividad antirradicalaria, la cual se atribuye a los fenoles carvacrol y timol presentes en el mismo (Granados, Santafé, & Yáñez, 2012). Las características antioxidantes de los aceites esenciales en animales en donde se han determinado que contienen un nivel elevado de ácidos grasos poliinsaturados se encuentran en las capas fosfolípicas de los tejidos, que actúan como un captador de radicales libres que intervienen en sistema inmunológico como una respuesta de defensa del cuerpo.

Otras investigaciones que han realizado como por ejemplo en aves, expresan que

disminuye la oxidación lipídica en la yema de huevo al alimentarlos con suplementos de timol los cuales se almacenan a bajas temperaturas. Para la recolección de estos datos analizaron la formación de malondialdehído, en un determinado tiempo y eliminado o reduciendo el proceso oxidativo adicional (Torrenegra, 2014).

La actividad oxidativa de plantas aromáticas se puede evidenciar entre varias especies de orégano al observar grupos hidroxilo de compuestos fenólicos. El potencial antioxidante del orégano se puede determinar con diferentes métodos, por su capacidad para inhibir la degradación oxidativa de los lípidos de modo que protege al ADN de posibles daños que causan los radicales hidroxilos (Arango, Hurtado, Pantoja, & Santacruz, 2012).

Investigadores como Arango et al., (2012) y Arcila, (2004) confirman que el potencial antioxidante de extractos y aceites esenciales de diferentes variedades de orégano y la actividad antioxidante puede variar según el solvente extractante; como ejemplo se puede demostrar que, los agentes lipofílicos son más efectivos para la obtención de antioxidantes en las emulsiones. El aceite esencial obtenido a partir de la especie *O. vulgare* tiene potencial antirradical, la cual se ha demostrado, es atribuída por los monofenoles carvacrol y timol (*O. vulgare*, *O. compactum*, *O. majorana*).

Recientemente, se ha visto acrecentado el interés en los aditivos naturales con propiedades antioxidantes, siendo así, muchas especies vegetales se han estudiado en los últimos años, como fuentes potenciales de antioxidantes, entre las cuales se destacan varias plantas aromáticas y especias. Los antioxidantes alimentarios son sustancias que pueden impedir, retrasar o inhibir las oxidaciones catalíticas y los procesos que inducen la formación de radicales libres en los alimentos y bebidas; esta capacidad de retardar el proceso de peroxidación de los lípidos se determina en los aceites y alimentos grasos, incluso se toma en cuenta la tendencia de los consumidores hacia productos alimenticios libres de aditivos alimentarios cuyo origen sea la síntesis química (neutralizantes, preservantes, antioxidantes, colorantes y saborizantes) (Arango et al., 2012; Arcila, 2004).

CAPÍTULO 3

MARCO METODOLÓGICO

3.1 Nivel de Investigación

La metodología y fuentes de información aplicadas en el presente estudio iniciaron con una investigación exploratoria, para lo cual se consideraron los trabajos publicados, el conocimiento preliminar que tiene el investigador, la información no escrita que puedan relatar las personas a partir de sus experiencias y los avances predominantes que el tema ha tenido en un lapso determinado. De esta manera, el investigador logra obtener conocimientos sobre el tema, alcanzar una investigación más precisa sobre un problema poco estudiado, aclarar conceptos y posibilitar la creación de instrumentos.

Para complementar este trabajo se realizó una investigación experimental, en la cual se manipularon variables altamente controladas, replicando un ensayo concreto y observando el grado en que las variables implicadas y manipuladas producen un efecto determinado. Los datos se obtienen de muestras aleatorizadas, de manera que se determina la muestra que tenga las características óptimas de estudio y permiten establecer diferentes hipótesis y contrastarlas a través del método científico (Baptista, Fernández, & Hernández, 2015).

3.2 Variables de estudio

Variable independiente:

Pretratamiento aplicado a la muestra (Muestra fresca y Muestra seca)

Variable dependiente:

- Aceite esencial obtenido
- Capacidad antioxidante del aceite esencial

Variables Intervinientes

- Condiciones ambientales
- Condiciones de laboratorio

3.3 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Las técnicas e instrumentos que se utilizaron para la recolección de datos son el análisis documental, a través del uso de las herramientas informáticas, como: Word 2013 para la edición de información teórica y Excel 2013 para la tabulación de datos; mientras que durante la observación se utilizó: diario de campo y cámara fotográfica.

3.4 Técnicas de procesamiento y análisis de datos

Inicialmente se realizó una recopilación documental y luego se recolectaron los datos de la fase experimental a partir de la observación y de las mediciones realizadas en las pruebas de laboratorio; para el posterior análisis se hizo uso de las herramientas estadísticas para analizar la relación entre las variables dependiente e independiente.

3.5 Recolección de la materia prima

La recolección de la materia prima se realizó en la Provincia de El Oro, en el Cantón Arenillas; el cual tiene una temperatura promedio de 29°C. De acuerdo a la norma NTON-14002-02 (2001) el orégano fue recogido de manera manual, escogiendo las hojas más tiernas y sin daños que se encontraban disponibles. Estas muestras fueron depositadas en empaques resistentes, debidamente rotulados con nombre y fecha de recolección para su posterior identificación, por último, los empaques fueron llevados al laboratorio para su posterior limpieza con agua destilada esterilizada y pesado.

3.6 Preparación de las muestras

Una vez ubicadas las muestras en el laboratorio, se procedió con la limpieza, esterilización y registro de peso. A continuación, se realizó una división en cuatro partes iguales de las muestras, para iniciar con el proceso de análisis experimental de la investigación. Las muestras fueron categorizadas de la siguiente manera:

1. Muestra fresca sin ultrasonido
2. Muestra seca sin ultrasonido
3. Muestra fresca con ultrasonido
4. Muestra seca con ultrasonido

A continuación, en la Figura 2 se puede observar cómo los tratamientos de estudio fueron divididos.

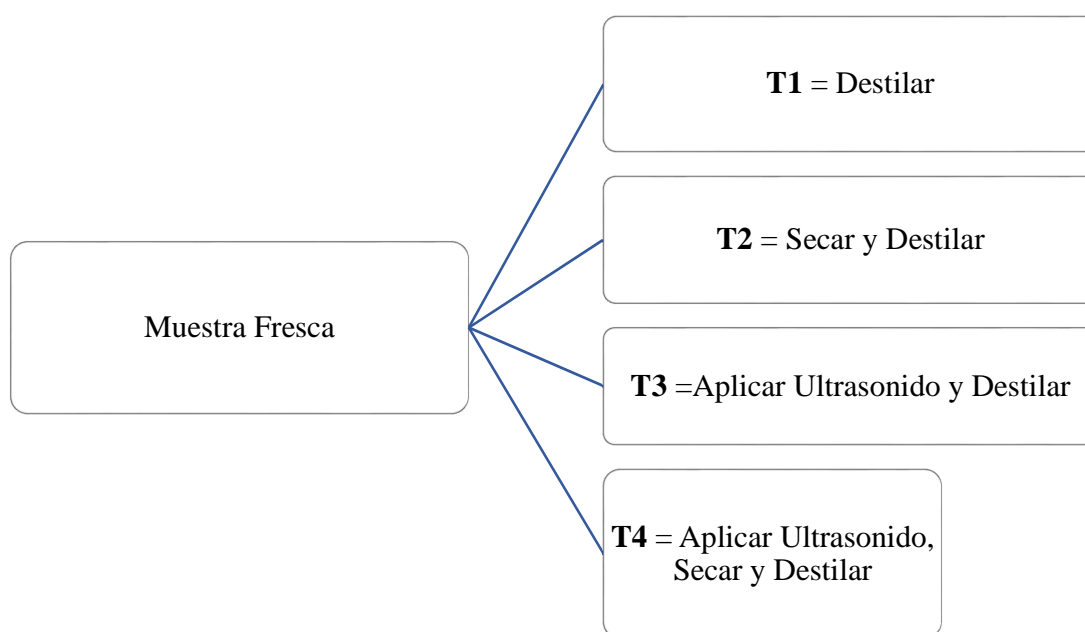


Figura 2. Tratamientos de estudio de la capacidad antioxidante del orégano

3.7 Extracción del aceite vegetal

3.7.1 Ultrasonido

El proceso de Ultrasonido (US) nos permite mejorar la calidad de los productos debido a la alta potencia, esta técnica se usa con intensidades mayores a 1 W.cm^2 y frecuencias con un rango de 20 y 500 kHz. La técnica es muy frecuente en el procesamiento, conservación e inocuidad de alimentos, ha sido utilizada como opción para optimizar la microestructura y modificar las características organolépticas para aumentar la vida de anaquel y calidad de productos alimenticios (Carranza, Corona, Martínez, & Ruíz, 2016).

Para el presente estudio se aplicó Ultrasonido con el uso del equipo FISHER SCIENTIFIC FS 20D aplicado en hojas frescas y sin cortes, por un tiempo de 15 minutos.

3.7.2 Secado de la muestra

Para el proceso de secado fue utilizado con y sin ultrasonido de muestras, en donde las muestras fueron colocadas en la estufa a una temperatura de $40 \text{ }^\circ\text{C}$ durante un tiempo de 40 minutos aproximadamente, con la finalidad de alcanzar un grado de contenido de humedad aceptable y poder ser almacenadas por períodos prolongados evitando que se produzcan pérdidas significativas y así no disminuir el valor comercial del producto, aumentando los rendimientos de extracción del aceite vegetal en el proceso de destilación.

Considerando la metodología de Larrasoña (2010), este proceso se da en tres etapas: al inicio del secado se eleva gradualmente la temperatura de la muestra y la presión interna del vapor y finaliza al transferir calor equivalente a la masa; en la segunda etapa, el agua libre pasa por una tasa constante de secado, mientras exista un nivel de agua apta para acompañar la evaporación. En la tercera etapa, desciende la tasa de secado, se reduce la migración de la humedad desde la superficie interior a la exterior del producto, causando que la transferencia de calor no sea compensada con la transferencia de masa.

3.7.3 Destilación por arrastre de vapor con agua

Acoplando el método descrito por Cerutti & Neumayer (2004), en primer lugar, se prepara el equipo de escala industrial, cuyo funcionamiento se indica en la Figura 3 en un equipo utilizado a nivel de laboratorio. Primero se colocó agua destilada en el matraz 1, generador de vapor, después en el matraz 2 se agregan las muestras de orégano (considerando las muestras T1, T2, T3 y T4). Se requiere vigilar que no existan fugas de vapor u obstrucciones con las hojas de orégano, para facilitar el paso adecuado de la corriente de vapor.

En este proceso, se calienta el matraz 1 hasta la ebullición del agua, con el fin de generar el vapor que pasará al matraz 2; extrayendo de esta manera el aceite esencial del orégano, el cual es inmediatamente arrastrado por el vapor de agua en el proceso de destilación. El calentamiento se suspendió cuando el volumen del destilado era de 2000 a 2500 ml aproximadamente.

De este destilado se extrajo totalmente el aceite esencial, colocando en el embudo de separación del destilado y separando la mayor parte de la fracción acuosa. Al final de este proceso la fase acuosa se desechó y el extracto orgánico se recolectó en un matraz Erlenmeyer.



Figura 3. Equipo industrial de destilación por arrastre de vapor

Fuente: La Autora (2019)

3.7.4 Determinación de las características físico-químicas

En la determinación de las características físico-químicas se realizaron tres repeticiones en cada una prueba, como se indica a continuación:

3.7.4.1 Determinación de la densidad

Se llevó a cabo según la norma NTE INEN 0035 (2012). Para la determinación de la densidad, se pesó el picnómetro limpio y seco. A continuación, se llenó el picnómetro con agua destilada hervida a 20 °C, y se sumergió en un baño de agua a 20 °C \pm 0,2 °C durante 30 minutos, evitando la inclusión de burbujas de aire. Se secó el exterior del picnómetro y se pesó. Luego se realizó el mismo procedimiento utilizando los aceites esenciales. El cálculo se realizó con la ecuación **Ec. 1**:

$$Densidad = \frac{m_2 - m}{m_1 - m}$$

(Ec.1)

Donde:

ρ = densidad relativa.

m = masa del picnómetro vacío (g)

m₁ = masa del picnómetro con agua destilada (g)

m₂ = masa del picnómetro con muestra, (g)

3.7.4.2 Índice de refracción

Se llevó a cabo según la norma NTE INEN ISO 6320 (2013). Para la determinación del índice de refracción, primero se verificó la limpieza y sequedad de los prismas del refractómetro. Luego se colocaron 2 o 3 gotas de aceite esencial a 20 °C sobre el prisma inferior, se cerraron los prismas y se ajustó el instrumento hacia la luz para obtener una lectura clara.

3.7.4.3 Solubilidad en alcohol

Para la determinación de la solubilidad del aceite se consideró las NORMA NMX-K-081-1976 (1973). Se agregó con una pipeta 1 ml del aceite esencial y se transfirió a un matraz, el cual se introdujo en un baño María a 20 °C. En estas condiciones de temperatura, con la bureta se añadió etanol al 96% en proporciones de 0,1 ml, hasta la disolución del aceite y sucesivamente en porciones de 0,5 ml, hasta un volumen máximo de 20 ml, agitando vigorosamente después de cada adición. Al final, cuando se obtuvo una disolución limpia y se anotaba el dato del volumen, en el caso de producir turbidez antes de haber agregado el etanol, se anotaba el volumen con el que apareció la turbidez y el volumen con el cual desaparecía.

3.7.4.4 Determinación del porcentaje de ácidos grasos libres

Se llevó a cabo según la norma NTE INEN ISO 660 (2013). Para la determinación del porcentaje de ácidos grasos libres, se pesaron 5 g de muestra y se colocaron en 25 mL de etanol neutralizado. Después se titularon los ácidos grasos libres con una solución de NaOH 0,1 N previamente estandarizada y utilizando fenolftaleína como indicador. El cálculo se realizó con la ecuación 2:

$$\%AGL = \frac{V * M * N}{10 * m(\text{aceite})} \quad (\text{Ec.2})$$

Donde:

V= volumen de NaOH usado para la titulación (ml)

M= peso molecular ácido esteárico ($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$)

N= normalidad de la solución de NaOH ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

M_{aceite} = peso de la muestra de aceite (g)

3.7.4.5 Determinación del índice de saponificación

Según Torrenegra (2014), el índice de saponificación se representa como número de mg de KOH necesarios para saponificar 1 g de grasa. Primero se pesan 2 g de muestra en un matraz de 250 ml y se adicionan 50 ml de solución alcohólica de KOH 0.5 N, luego se acopló al matraz un condensador para reflujo, se esperó que hirviera por 60 minutos y se dejó enfriar. Después añadieron 50 ml de agua destilada, 4 gotas de fenolftaleína al 1% y se valoró con ácido clorhídrico 0.5 N. Posteriormente, se analizó el valor de un blanco operando en las mismas condiciones, pero sin la muestra, los cálculos se realizaron con la ecuación 3:

$$\text{Índice saponificación} = \frac{(V1 - V2) * 0,5N * 56,1}{P} \quad (\text{Ec.3})$$

Dónde:

V1 = Volumen utilizado de KOH (ml) en el blanco.

V2 = Volumen utilizado de KOH (ml) en la muestra.

P = Peso de la muestra en gramos.

3.7.4.6 Determinación del índice de ésteres

Según la Norma NMX-K-395-1972 (1972), el índice de ésteres se determina a partir de los resultados obtenidos del índice de saponificación y el índice de acidez (% de ácidos grasos libres), los cálculos se realizaron con la ecuación Ec. 4:

$$\text{Índice ésteres} = \text{IS} - \text{IA} \quad (\text{Ec.4})$$

Dónde:

IS= Índice de saponificación

IA= Índice de acidez

3.7.5 Caracterización cuantitativa

3.7.5.1 Cuantificación de fenoles

Los compuestos fenólicos de los aceites esenciales de orégano se cuantificaron por el método colorimétrico a través del reactivo de Folin-Ciocalteu, que permite medir la coloración azul formada, mediante espectrofotometría de amplio espectro a 750 nm (Flores, 2006). El fundamento teórico de esta prueba se basa en la reacción de molibdato sódico y wolframato sódico en ácido fosfórico con los compuestos fenólicos, que tienen grupos OH, presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico se encuentra compuesto por las dos sales en medio ácido, se reduce por los grupos fenólicos, lo que da lugar a una reacción que genera coloración azul intenso (Gutiérrez et. al., 2008).

El protocolo utilizado para el análisis de las muestras de orégano se basa en la investigación de Gutiérrez et. al. (2008), con modificaciones en las concentraciones de los

reactivos. Se preparó una solución patrón de ácido gálico de 1000 ppm, para lo cual se aforó 25 mg de ácido gálico de alta pureza en un balón de 25 ml con agua destilada, se recomienda siempre utilizar una solución recién preparada. También se preparó una solución de carbonato de sodio al 20% aforando 5 g de carbonato de sodio en un balón de 25 ml, llevándolo al ultrasonido por el tiempo necesario para conseguir una disolución completa y homogénea. Para el reactivo de Folin se utilizó el reactivo comercial de la marca Sigma-Aldrich que posee una concentración 2 N, se realiza una dilución 1:2 con agua destilada, el reactivo de Folin siempre debe estar en refrigeración y protegido de la luz hasta el momento de la utilización.

Para la curva de calibración se diluyó la solución madre para obtener concentraciones de 0 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L, 40 mg/L y 50 mg/L para esto se prepararon seis viales ámbar con las cantidades de reactivos expuestas en la Tabla 1.

Tabla 1. Preparación de curva de calibración de los fenoles totales

Muestra	Reactivo de Folin 1 N		Carbonato de sodio 20%	Agua destilada
0 µL	250 µL	Agitar en la oscuridad	250 µL	1500 µL
10 µL	250 µL		250 µL	1480 µL
20 µL	250 µL		250 µL	1460 µL
30 µL	250 µL		250 µL	1440 µL
40 µL	250 µL		250 µL	1420 µL
50 µL	250 µL		250 µL	1400 µL

A continuación, se dejó reposar en la oscuridad durante 2 horas, agitando cada 30 minutos de forma vigorosa y las muestras se leyeron finalmente a una longitud de onda de 760 nm en un equipo UV-VIS (Jasco V-630).

Para el análisis de muestras se preparó una solución de los aceites esenciales 1:100 en DMSO, de las cuales se tomó una alícuota de 50 µL de cada muestra, luego se añadió 250 µL de reactivo de Folin 1N y 3950 µL de agua destilada, se dejó en reposo durante 5 minutos antes de añadir 750 µL de carbonato de sodio 20%, se agitó fuertemente y se dejó reposar

durante 60 minutos en un lugar oscuro, agitando cada 30 minutos antes de leer las muestras a una longitud de onda de 760 nm en un equipo utilizado anteriormente.

3.7.6 Determinación de la actividad antioxidante

Se analizó la capacidad antioxidante de los cuatro aceites esenciales obtenidos mediante el método para la actividad inhibitoria del radical libre DPPH de Guija et al., (2015). Se preparó el reactivo DPPH con 49 mg del mismo por cada 250 ml de etanol y se almacenó en la oscuridad. Las soluciones de aceite de orégano se prepararon como se indica en la Tabla 2.

Tabla 2. Soluciones de aceite esencial de orégano

	Volumen Muestra	Volumen DMSO	Volumen DPPH
Blanco	-----	100 µL	2,9 ml
1	1 µL	99 µL	2,9 ml
2	5 µL	95 µL	2,9 ml
3	10 µL	90 µL	2,9 ml
4	20 µL	80 µL	2,9 ml
5	50 µL	50 µL	2,9 ml
6	80 µL	20 µL	2,9 ml
7	100 µL	-----	2,9 ml

Para aplicar esta técnica, primero se preparó una solución de DPPH (1×10^{-4} molar en etanol) con 24 horas de anticipación. Después, se utilizaron como muestras de aceites esenciales, para ello se prepararon diluciones en diferentes concentraciones: 1 µL, 5 µL, 10 µL, 20 µL, 50 µL, 80 µL y 100 µL en frascos ámbar y adicionar dimetilsulfóxido (DMSO) hasta completar 100 µL con. A estas disoluciones se les añadieron 2,9 ml de la solución de DPPH y se agitaron constantemente por 30 minutos protegidas de la luz con papel de aluminio. Al final, se colocaron las muestras en las celdas de vidrio y se determinó la

absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 517 nm (Coronel & Piedra, 2014).

El porcentaje de inhibición del radical DPPH se calculó con la siguiente ecuación 5:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{A_c - A_m}{A_c} * 100$$

(Ec. 5)

Donde:

A_c = Es la absorbancia del patrón de referencia

A_m = La absorbancia de las soluciones diluidas del aceite esencial de la especie vegetal

3.7.7 Análisis estadístico

En el análisis estadístico se realizó una clasificación, tabulación y comparación de datos, posterior a ello se aplicará un análisis estadístico (Prueba de Normalidad, ANOVA, Prueba de Tukey), mediante un diseño completamente al azar, evaluando el porcentaje de inhibición (actividad antioxidante) de los aceites esenciales obtenidos a través de diferentes pretratamientos.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis de la toma de muestras y tratamiento de la muestra vegetal

Para la recolección de las muestras se consideró la apariencia de las hojas de las plantas, controlando condiciones de esterilidad para obtener un material de alta calidad. Las hojas recogidas se lavaron con agua para eliminar las impurezas (residuos de tierra), sin exagerar en el lavado para evitar la pérdida de componentes solubles. Posteriormente, se realizó la selección de las hojas y pesaje de las mismas en una balanza Ohaus Pioner PA3106, de las cuales se obtuvo un total de 12,215 kg que se emplearon para la extracción de aceites.

4.2 Análisis del proceso de ultrasonido

Actualmente, se han desarrollado investigaciones para determinar la inactivación de microorganismos debido a la aplicación de ultrasonido de alta intensidad, de forma que se logre deducir el mecanismo de acción por la muerte celular, generando varias teorías, entre ellas: la temperatura, la cavitación, la formación de radicales libres, el calentamiento localizado, la formación de radicales libres, el aumento de la temperatura y la presión, entre otras (Javier, 2011).

Javier (2011), determinó que el ultrasonido es una técnica no destructiva de tejidos, no produce ninguna reacción secundaria comprobada ni alteraciones o modificaciones genéticas. Además, mejora la asimilación de las proteínas gracias a los procesos de cavitación y el rompimiento de cadenas de aminoácidos, mejorando las características nutricionales, potenciando los procesos de homogenización e inactivando un 90 % de las enzimas. En la presente investigación se utilizaron tiempos de secado de 35 minutos.

El ultrasonido tiene diversas formas de acción, entre ellas están: térmicas, la cual genera energía mecánica o calórica; y no térmicas, las cuales son la fuerza de radiación, la

rarefacción, la cavitación, choques micro-mecánicos y la formación de radicales libres, producto de los cuales se obtuvieron varias observaciones que se indican a continuación:

Tabla 3. Mecanismos de acción del Ultrasonido

Teoría	Mecanismo	Observaciones
Cavitación	Eliminación mecánica por atrapamiento de la bacteria, a través de burbujas localizadas con altas temperaturas y presiones.	Procesos de desinfección, lisis celular e inactivación enzimática
Formación de radicales libres	Sonólisis del agua puede producir iones (OH ⁻) y (H ⁺) y peróxido de hidrógeno.	Inactivación microbiana y enzimática
Choques micro-mecánicos intracelulares	Disrupción de las células y disminución del espesor de paredes celulares	Efectos antimicrobianos, lisis celular e inactivación enzimática
Generación de energía calórica y mecánica	Propagación de la onda; decrece con la distancia al ser aplicado en material atenuante. Esta porción que es absorbida se traduce en calor	Inactivación microbiana.
Compresión y rarefacción	Microcorriente acústica	Inactivación microbiana y enzimática.

Fuente: Torrenegra (2014)

4.3 Secado de la muestra

Uno de los pretratamientos que se aplicó fue el proceso de secado, que se utilizó para eliminar la humedad de la muestra, aplicando una temperatura de 40 °C en un tiempo de 50 minutos.

La eliminación del agua ocurre en tres fases de secado; en la primera, se produce un corto período de estabilización inicial, en donde la muestra se encuentra a baja temperatura y la velocidad de evaporación aumenta, según la temperatura se incrementa. En el segundo

período de velocidad decreciente, se desplaza el plano de evaporación hacia el interior y disminuye con velocidad hasta alcanzar la humedad de equilibrio del producto. Y, para finalizar en la tercera etapa, las muestras estaban totalmente secas y listas para ser utilizadas en el proceso de destilación permitiendo que los rendimientos de extracción aumentaran. (Chacón, Cordero, & Pineda, 2009).

4.4 Proceso de destilación por arrastre de vapor con agua

A través de este proceso, se obtuvieron los aceites esenciales, producto de las hojas a las que se aplicó la técnica de secado o ultrasonido para determinar los diferentes rendimientos de producción. Una de las principales características (obtenidas) fue la inmiscibilidad de los compuestos entre sí; así mismo, se determinó que los compuestos de alto punto de ebullición pueden ser aislados o purificados al combinarlos con algún líquido inmiscible de bajo punto de ebullición como el agua. Se utilizó agua para la aplicación de la técnica, ya que presenta ventajas como el fácil acceso, bajo precio, a nivel químico tiene un bajo peso molecular, además, que destila muestras con puntos de ebullición elevados. Aprovechando la propiedad que tienen las moléculas de agua en estado de vapor de asociarse con moléculas de aceite, la extracción se efectuó cuando el vapor por presión entra en contacto con las células de las partes de las plantas y las rompe liberando la esencia y atrapándola en las gotas de agua del vapor que luego se condensa en el destilador. Al culminar el proceso, se debe enfriar el equipo antes de permitir la entrada de aire.

El resultado de este proceso, es decir, el rendimiento del aceite esencial de orégano en cada uno de sus tratamientos, como se muestra:

Tabla 4. Resultados de los rendimientos obtenidos en las extracciones de aceite de orégano en los diferentes tratamientos

Tratamiento	Rendimiento (%)
Fresco (T1)	0,053
Seco (T2)	0,116
Fresco/US (T3)	0,073
Seco/US (T4)	0,137

Para el cálculo del rendimiento se consideró la masa del aceite obtenido y la masa de la muestra utilizada. Después del análisis de cada uno de estos, se dedujo matemáticamente que el pretratamiento de secado, con y sin el proceso de ultrasonido (T2 y T4) fue el de mayor rendimiento de obtención, siendo el tratamiento 4 (T4) el que alcanzó un valor de 0,137%. Esto se pudo corroborar según las investigaciones de Martínez (2012) y Campo, et al. (2016), el ultrasonido permite que la longitud de onda, la frecuencia y la intensidad de manera que se puedan obtener mejores tiempos y formas de homogenización, así como la transferencia de masa y energía, con el fin de aumentar el rendimiento del aceite esencial, como se puede observar a continuación en la figura 4.

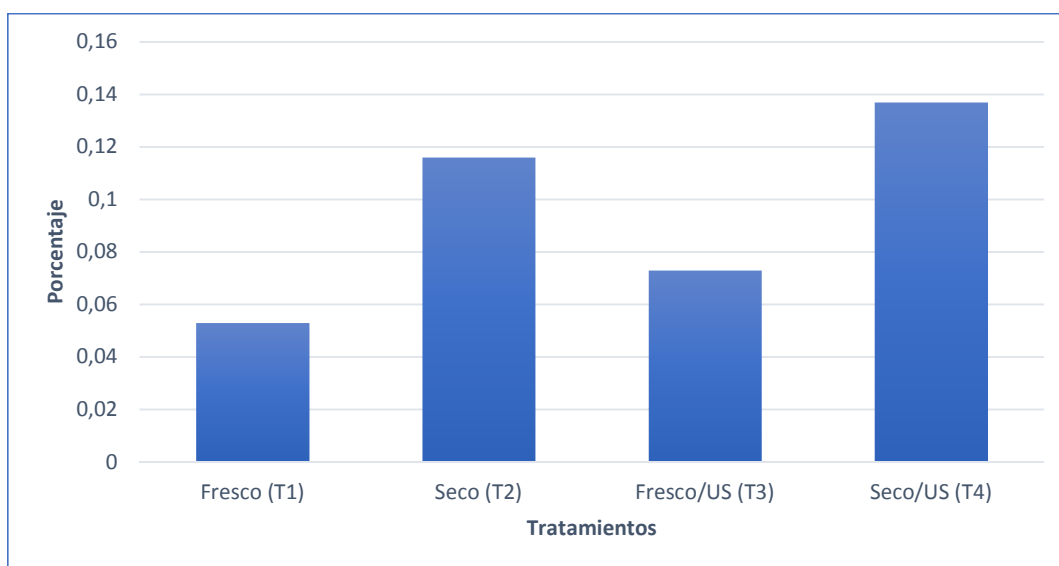


Figura 4. Histograma de los rendimientos obtenidos en cada tratamiento

4.5 Análisis de las características físico químicas del aceite esencial de orégano

Los resultados obtenidos en los parámetros físico químicos del aceite esencial de orégano en cada uno de los tratamientos, se indican en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Resultados de los parámetros físico químicos de los aceites esenciales de orégano producidos en los tratamientos

Parámetro	T1	T2	T3	T4
Densidad a 20 °C (g*mL ⁻¹)	0,924	0,911	0,935	0,917
Índice de refracción a 20 °C	1,500	1,497	1,503	1,487
Solubilidad en alcohol	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
% Ácidos grasos libres	5,460	5,350	5,310	5,390
Índice de saponificación (mg KOH/g de grasa)	131,65	129,22	123,23	123,23
Índice de ésteres (mg KOH/g de grasa)	126,19	117,85	117,88	117,88

Los valores de los parámetros fisicoquímicos corresponden a un promedio de tres repeticiones por determinación.

Las densidades de los aceites obtenidos obtuvieron rangos entre 0,911 a 0,935 g*mL⁻¹, comprobando los datos obtenidos en investigaciones de Bejarano, et al (2012) y Abraham, et al (2016), que fueron de 0,923 y 0,933 g*mL⁻¹ presentando similitud. El resultado de la densidad del presente trabajo, indica la calidad y la pureza del aceite extraído, que no estaba ligado al tipo de extracción, pero si probablemente por la naturaleza de la planta y las condiciones climáticas del área geográfica de procedencia.

Los índices de refracción estuvieron en un rango de 1,487 a 1,503, el mismo que se encuentra próximo a la investigación realizada por Rodas (2012); la cual reporta un valor mínimo de 1,473 y máximo de 1,474, indicando una característica propia del aceite esencial en estudio.

En relación a la solubilidad del aceite esencial de orégano, los volúmenes utilizados fueron 4.2 mL para 96°; 5.7 mL para 90° y 8.1 mL para 85° C de alcohol etílico, los mismos que

son similares a lo relatado por Abraham et al., (2016), los cuales se encuentran en un rango de 5,0 y 8,5 volúmenes de alcohol de 90 % (v/v) a 20 °C, Siendo resultados razonables, ya que se emplean normalmente disoluciones de alcohol etílico de elevada graduación alcohólica, comprendidas entre 80 y 96%, y la solubilidad será mayor respecto a la pureza en componentes oxigenados (Coronel & Piedra, 2014).

Los porcentajes de ácidos grasos libres fueron de 5,310 a 5,460%, aspecto que coincidió con la opinión de diversos autores en el sentido de que el aceite fue recién preparado no contienen ácidos grasos libres o están presentes en pequeñas cantidades (Abraham, et al. 2016). El análisis del índice de saponificación permitió determinar qué cantidad de KOH se requiere para producir jabón, los índices de saponificación de las muestras de aceite obtenidas fueron entre 123,23 a 131,65 mg KOH/g, que fue relativamente alto. Esto se dio porque se necesita una mayor cantidad de KOH para llegar al equilibrio de la reacción con relación a los ácidos grasos libres y combinados de cadena corta que contiene el aceite (Bejarano, et al. 2012).

El último parámetro físico-químico relacionado fue el índice de ésteres del aceite, donde se determinaron índices ésteres 117,88 a 126,19 mg KOH/g en los tratamientos realizados en la extracción de aceite, definiendo que la cantidad KOH para saponificar la grasa neutra de un gramo de aceite, es pequeña, porque el aceite fue recién obtenido y no pasó por procesos de oxidación para la formación de ácidos grasos libres, por lo que necesita una mayor cantidad del reactivo para formar la reacción (Coronel & Piedra, 2014).

A partir de las investigaciones de Abraham, et al., (2016) y Torrenegra (2014), los resultados obtenidos fueron comparados y comprobados, debido a que en las extracciones se utilizó destilación de arrastre de vapor con agua que permitió obtener buenos rendimientos y sin alterar sus composiciones, además las pruebas físico-químicas demuestran que los aceites obtenidos son similares a los presentados en diferentes investigaciones e indican su pureza y alta calidad.

4.6 Análisis cuantitativo de fenoles

En la Tabla 6 se indican los resultados de la cantidad de fenoles, consiguiendo buenos resultados entre 29,974 a 59,630 mg GAE*g⁻¹. Así mismo, se pudo observar que los datos no tienen una diferencia significativa.

Tabla 6. Cuantificación de fenoles de los tratamientos de aceite de orégano

Tratamiento	Absorbancia	760.0 nm	Cantidad de Fenoles (mgGAE*g⁻¹)
T1	0,963	0,963	29,974
T2	1,636	1,635	47,751
T3	1,357	1,358	40,423
T4	2,084	2,084	59,630

El tratamiento 4 fue el que generó mayor cantidad de fenoles, con una cantidad de 59,630 mg GAE*g⁻¹, debido a que el agua es considerada el solvente universal por su alta polaridad; debido a esto es adecuada para captar solutos polares e iónicos (Beltran et al., 2013). La diferencia de producción de fenoles en los tratamientos los podemos observar en la figura 5, identificando y escogiendo como el mejor proceso de producción de polifenoles al tratamiento 4, en el que se utilizó un proceso de secado, aplicación de ultrasonido y destilación de arrastre de vapor con agua, debido a la eliminación de agua en las muestras y el mejoramiento de características sensoriales del orégano en el proceso de ultrasonido.

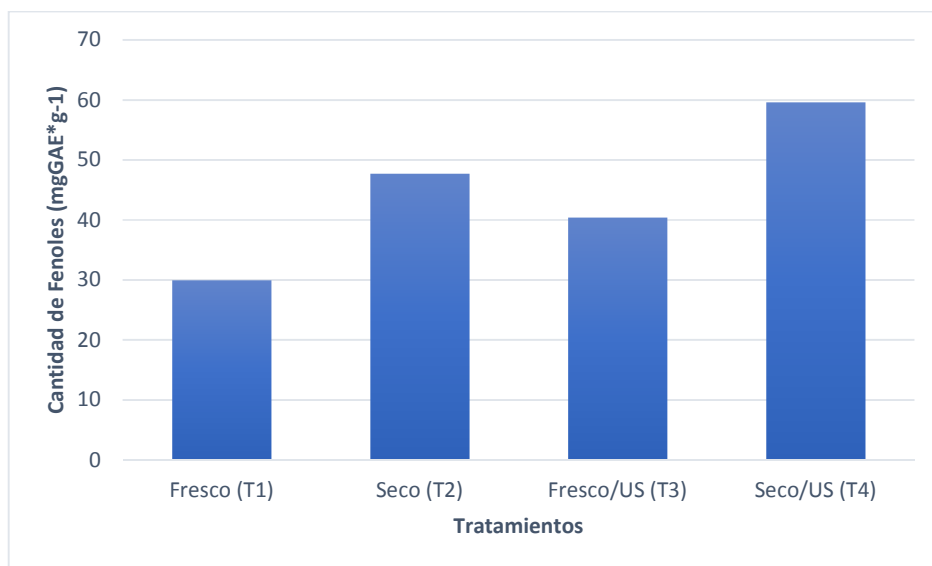


Figura 5. Histograma de cantidades de fenoles obtenidas en cada tratamiento.

En estudios como el de Sharma, Gupta & Verma (2015), se reporta resultados de $0,158 \pm 0,034$ mg GAE*g⁻¹, siendo el de mayor valor de tres tipos de extractos realizados con solventes polares y apolares, debido a que la eficiencia y la aceleración de extracción aumentan por la composición del solvente; sin embargo, estos métodos presentan dificultades para su aplicación comercial y son muy volátiles. Dentro de las características más importantes del orégano son los efectos anticarcinógenos y antimutagénicos que producen (Arcila, Loarca, Uribe, & González, 2004).

Gráfica de curva de calibración

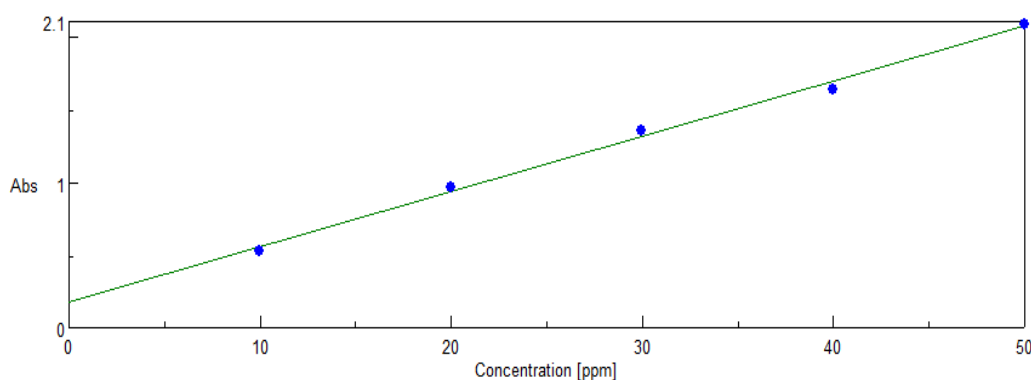


Figura 6. Curva de calibración para las concentraciones de los patrones y muestra vs la absorbancia

La Figura 6 muestra la curva de calibración donde todos los parámetros se encuentran dentro del intervalo especificado con 95% de límite de confianza. En la formación de la curva se observó que las absorbancias aumentaban, mientras se elevaba la concentración de las muestras. La gráfica se aproxima a una línea recta, donde la ecuación obtenida a partir del patrón fue $Y = 0,0378x + 0,177$ con un coeficiente de variación de 0,997.

4.7 Análisis de la actividad antioxidante del orégano

En el ensayo de DPPH se observó que la velocidad de reacción es directamente proporcional a la concentración del aceite, es decir, la mayor concentración de aceite fue mayor el porcentaje de inhibición. En este análisis se realizó cuatro estudios, en la cual se observó una actividad antioxidante final elevada y su aumento en el porcentaje de inhibición era lineal en los cuatro tratamientos.

En la Tabla 6 se indican los resultados obtenidos en el proceso de espectrofotometría a 517 nm del tratamiento de hojas frescas, donde no se aplicó ultrasonido de acuerdo a la metodología utilizada por Vega (2019). Se obtuvo una inhibición promedio de 44,62% y una desviación estándar de 28,65; debido a que las hojas tenían una mayor cantidad de humedad y no presentaron un proceso de ultrasonido que permite mejorar la homogenización con reducción del tamaño de las partículas, fundamentales en los procesos de extracción.

Tabla 7. Resultados obtenidos del aceite esencial con hojas frescas y sin ultrasonido

Muestra	Absorbancia	% Inhibición
Promedio		
1µL	1,43	0,23
5 µL	1,13	21,16
10 µL	0,98	31,63
20 µL	0,79	44,65
50 µL	0,49	65,58
80 µL	0,39	72,79

100 µL	0,34	76,28
	Promedio	44,62
	Desviación	28,65

En el tratamiento con hojas frescas y la aplicación de ultrasonido se obtuvo un porcentaje de inhibición promedio de 34,66% y una desviación estándar de 19,69 en el proceso de espectrofotometría a 517 nm. Los porcentajes de inhibición mejoraron debido a la aplicación de ultrasonido que permitió estabilizar a las hojas de orégano sin incrementar drásticamente la temperatura, Acosta et al., (2016) indica que se preservan las características sensoriales así como la selectividad, la productividad y el rendimiento, al aumentar los resultados relacionados con tiempos de procesos, mejora de calidad, además de la reducción de riesgos químicos y físicos, considerándose una tecnología amigable con el medio ambiental, ya que se emplea menos tiempo, agua y energías. Estos resultados se muestran a continuación:

Tabla 8. Resultados obtenidos del aceite esencial con hojas frescas y con ultrasonido

Muestra	Absorbancia Promedio	% Inhibición
1µL	1,50	6,44
5 µL	1,23	23,08
10 µL	1,26	21,21
20 µL	1,14	28,90
50 µL	0,79	50,73
80 µL	0,71	55,51
100 µL	0,69	56,76
	Promedio	34,66
	Desviación	19,69

En la Tabla 8 se indican los resultados obtenidos en el proceso de espectrofotometría a 517 nm del tratamiento hojas secas en donde no se aplicó ultrasonido. Se obtuvo una inhibición promedio de 46,54% y una desviación estándar de 29,67; debido a que el proceso de secado permitió eliminar la humedad de las hojas, logrando la conservación del principio activo del orégano y aprovechar al máximo cada una de sus propiedades antioxidantes. Consiguiendo un alto nivel de homogeneidad en la producción llevando a cabo en un proceso continuo, además, es un proceso controlado que solamente requiere ser operado por una persona consiguiendo una buena presentación del producto, aunque se utilizó altas temperaturas sin afectar las características del producto, velocidad en el proceso y obtención de altos rendimientos como lo describe Bonilla et al, (2015) en su estudio, al aumentar la concentración de los componentes principales de los aceites esenciales.

Tabla 9. Resultados obtenidos del aceite esencial con hojas secas y sin ultrasonido

Muestra	Absorbancia Promedio	% Inhibición
1µL	1,50	6,44
5 µL	1,26	21,21
10 µL	1,23	23,08
20 µL	0,81	49,69
50 µL	0,46	71,52
80 µL	0,38	76,30
100 µL	0,36	77,55
	Promedio	46,54
	Desviación	29,67

En el tratamiento con hojas secas y la aplicación de ultrasonido se obtuvo una inhibición promedio de 50,77% y una desviación estándar de 27,03. Este tratamiento presentó elevados porcentajes de inhibición, debido a que se combinaron los procesos de secado y ultrasonido que permitían que las muestras mejoraran sus condiciones para la extracción de aceites en el proceso de destilación, considerándolo como el tratamiento óptimo de generación de

antioxidantes. Una característica importante del ultrasonido fueron las ondas ultrasónicas de elevada frecuencia, ya que éstas estimulan, aceleran y mejoran el proceso al formar una sinergia con otras formas de energía, además se incrementa la cantidad de sustancias que se extraen y su solubilidad, como lo indican Ayala et al., (2018) y Acosta et al., (2016).

Tabla 10. Resultados obtenidos del aceite esencial de hojas secas y con ultrasonido

Muestra	Absorbancia Promedio	% Inhibición
1µL	1,19	10,78
5 µL	0,99	25,81
10 µL	0,79	40,35
20 µL	0,67	49,62
50 µL	0,42	68,17
80 µL	0,27	79,45
100 µL	0,25	81,20
	Promedio	50,77
	Desviación	27,03

En los cuatro tratamientos la actividad antioxidante del orégano fue alta, pero las muestras de aceite extraídas con hojas secas sometidas a ultrasonido tuvieron la más elevada actividad, con un valor de 50,77% en promedio, debido a que se eliminó la humedad de la muestra y aumentaron los rendimientos de obtención, siendo el tratamiento 4 el que presentó una mayor actividad antioxidante. Además, al comparar nuestros resultados con los aceites esenciales de otras plantas de la misma especie, indican que el aceite esencial de orégano posee un potencial de estabilización de radicales libres superior y puede ser semejante a los antioxidantes sintéticos BHA y BHT. Según Estarrón, et al (2016), esta especie puede ser considerada como prometedora para la producción de antioxidantes debido al elevado contenido de timol y al rendimiento de extracción.

Estos resultados también fueron comparados en la curva de calibración que se indica en la Figura 7, en donde se observa que el porcentaje de inhibición no aumenta de manera significativa mientras se elevaba la concentración de las muestras.

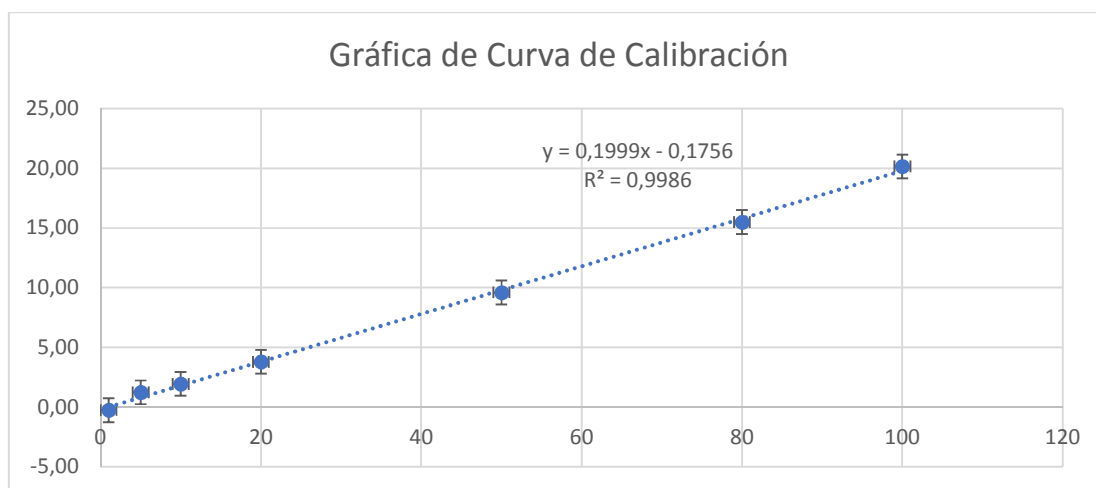


Figura 7. Curva de calibración de los resultados obtenidos de la actividad antioxidante.

Para el cálculo de porcentajes de inhibición se utilizaron las absorbancias de cada muestra y la siguiente ecuación $Y = 0,1999X - 0,1756$ con un coeficiente de variación de 0,9986. Los resultados que se muestran en la Tabla 10.

Tabla 11. Resultados obtenidos en la actividad antioxidante de la curva de calibración

Muestra	Concentración ppm	Absorbancia	517 nm	% Inhibición
1	0	1,136	1,135	
2	1	1,139	1,139	0,26
3	5	1,122	1,122	1,23
4	10	1,114	1,114	1,94
5	20	1,093	1,093	3,79
6	50	1,027	1,027	9,60
7	80	0,960	0,960	15,49
8	100	0,907	0,907	20,16
Promedio				7,42

En la figura 8, se indica el porcentaje de inhibición (actividad antioxidante) de cada uno de los tratamientos, en donde se observa que el tratamiento 4 fue el mejor proceso en la generación de actividad antioxidante con un resultado de 50,77%; mientras que, el tratamiento 2 fue aquel que generó el menor valor de porcentaje de inhibición con 34,66%, esto se pudo producir al no controlar los tiempos de secado, debido a que ésta es una técnica aplicada para comparar con mayor exactitud posible los resultados, ya que, si el tiempo de secado se eleva, el principio activo comienza a desnaturalizarse pudiendo generar decrecimientos de los porcentajes de inhibición al determinar la actividad antioxidante.

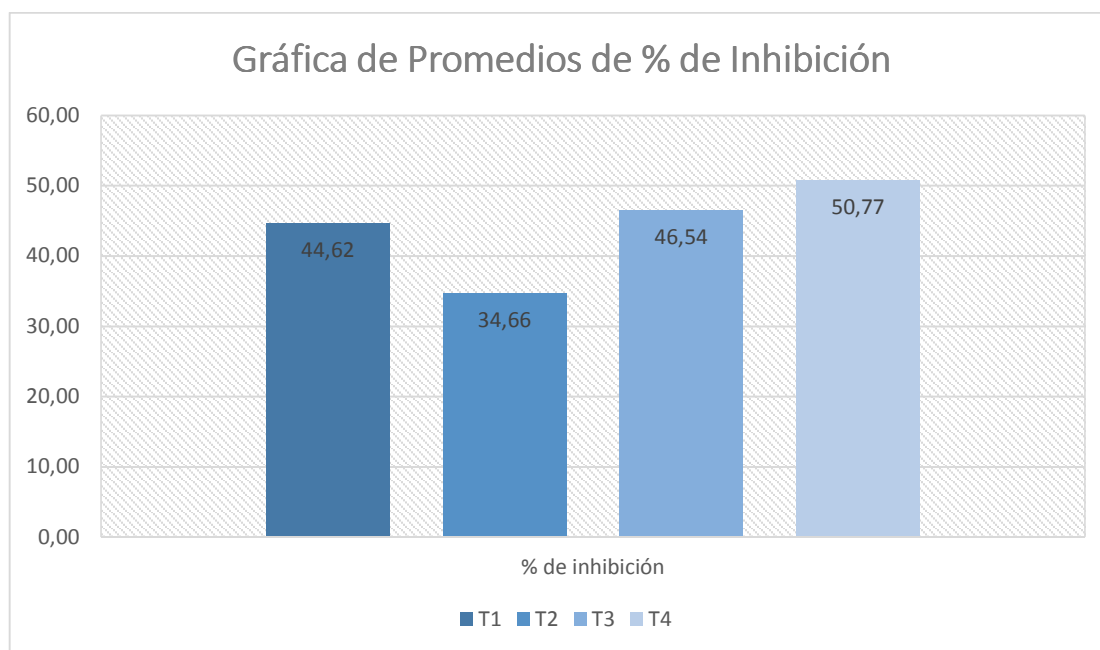


Figura 8. Histograma de cantidades de porcentaje de inhibición (actividad antioxidante) obtenidas en cada tratamiento

4.8 Análisis estadístico

Según el análisis matemático realizado, el tratamiento que mayor producción de polifenoles y actividad antioxidante fue el tratamiento 4 (T4), cuyo pretratamiento fue aplicación de ultrasonido y posterior secado de las hojas, obteniendo de esta manera extractos

de aceite con moléculas capaces de retardar o prevenir la peroxidación de lípidos, porque contiene varios metabolitos y sistemas de enzimas teniendo efectos sinérgicos e interdependientes. A continuación, se puede observar que, a mayor cantidad de fenoles, más elevado es el porcentaje de inhibición antioxidante en la figura 14.

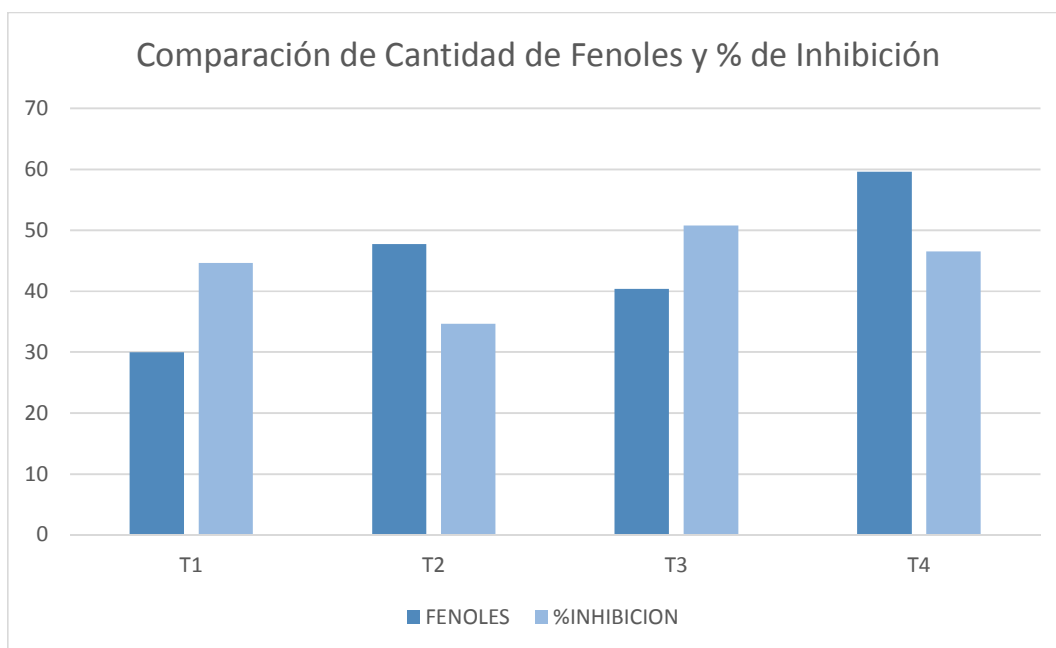


Figura 9. Gráfica de comparación de cantidad de polifenoles y el porcentaje de inhibición del aceite esencial de orégano.

En el análisis estadístico se realizó un estudio de normalidad de los datos de la inhibición de las muestras obtenidas de aceite en cada uno de los tratamientos en el programa Minitab 19, según la Prueba de Kolmogorov permitió observar el grado de concordancia que existió en la distribución de los resultados que se obtuvieron fueron aceptados e interpretados como satisfactorios, los cuales se indican en las Figuras 9, 10, 11 y 12.

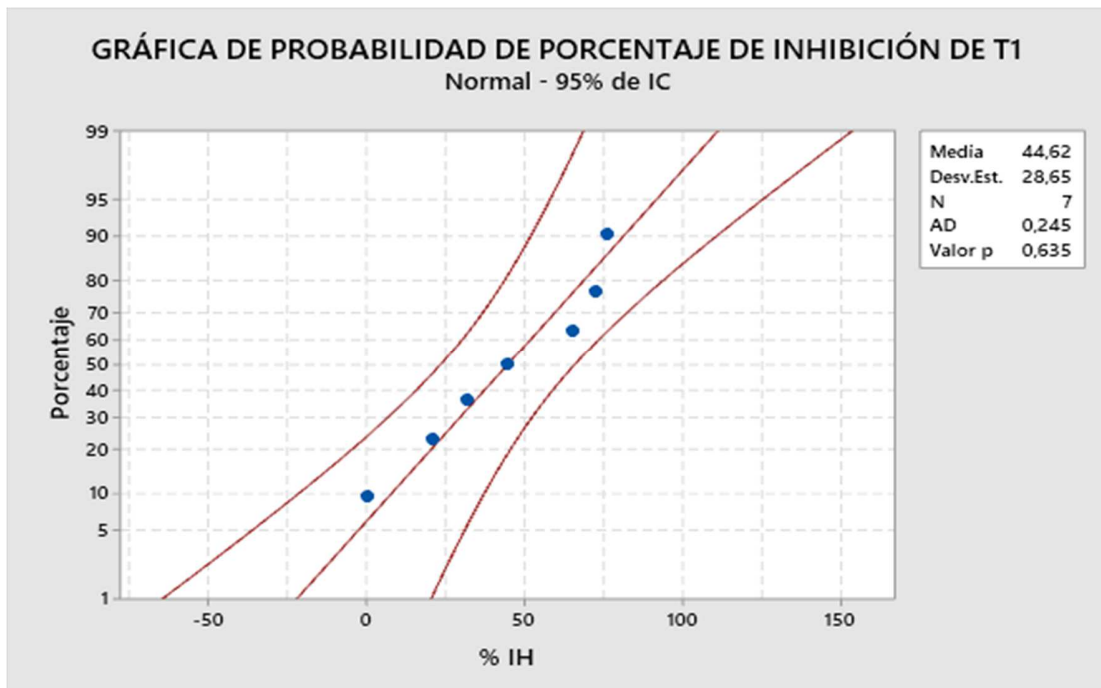


Figura 10. Gráfica de porcentaje de inhibición del aceite esencial de orégano obtenido de hojas frescas sin ultrasonido.

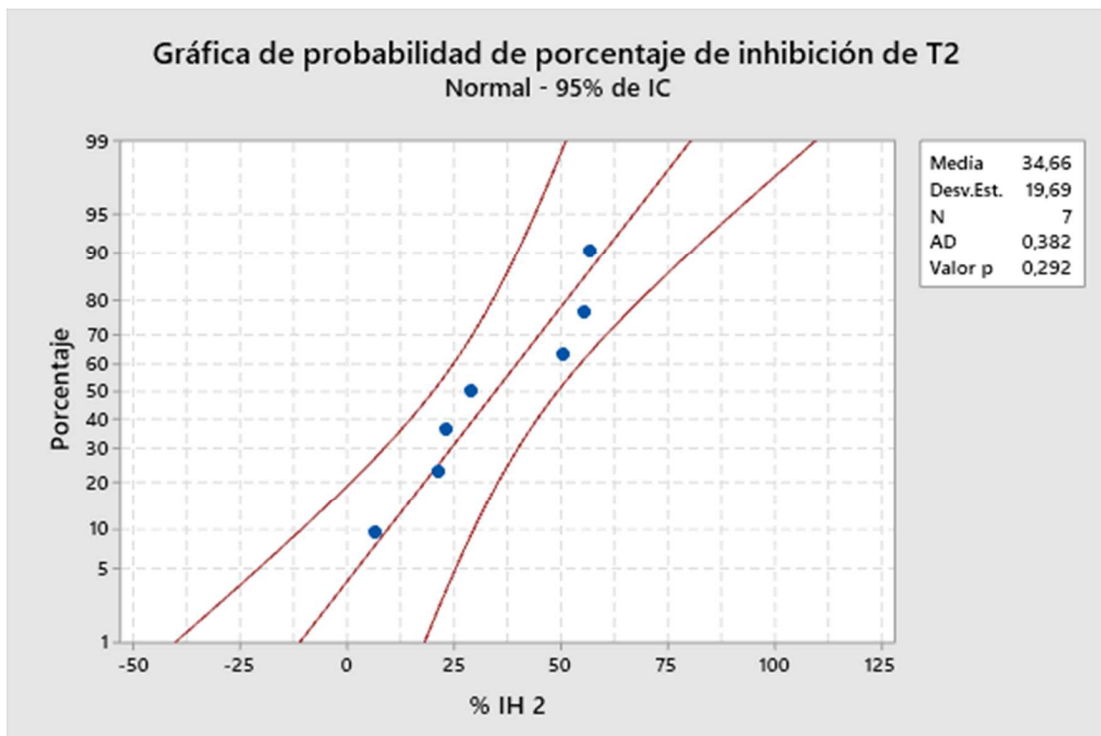


Figura 11. Gráfica de porcentaje de inhibición del aceite esencial de orégano obtenido de hojas frescas con ultrasonido

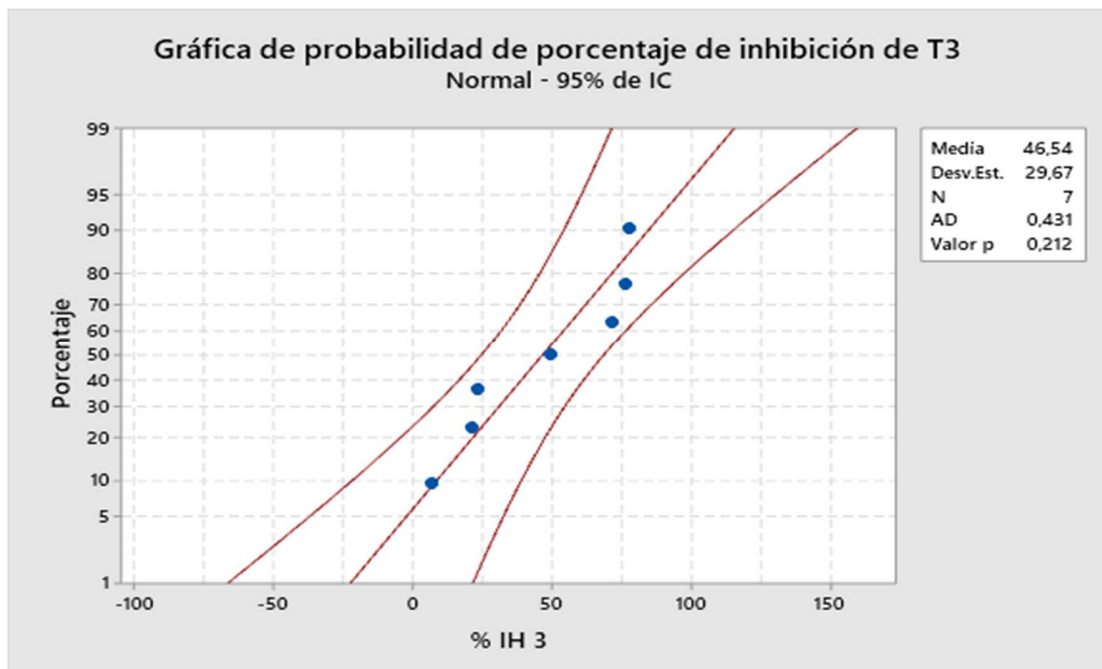


Figura 12. Gráfica de porcentaje de inhibición del aceite esencial de orégano obtenido de hojas secas sin ultrasonido.

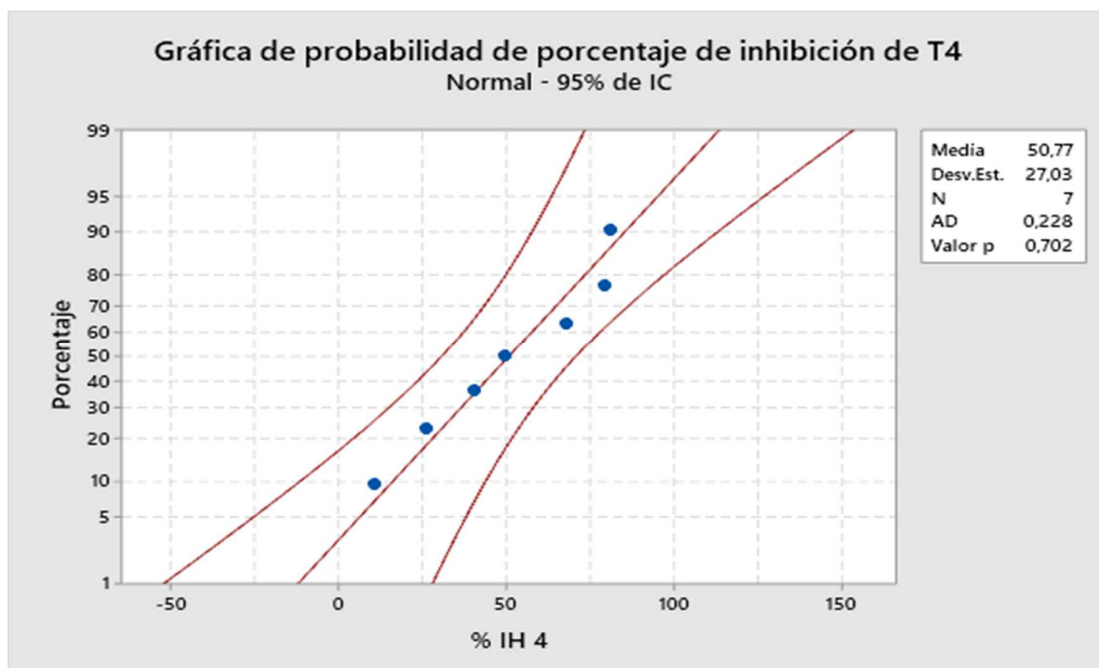


Figura 13. Gráfica de porcentaje de inhibición del aceite esencial de orégano obtenido de hojas secas con ultrasonido.

Con estos resultados se determinó que existe una distribución normal, además que, al comparar las significancias de cada concentración de los tratamientos, al tener un valor p mayor a 0,05 indica que se cumple la condición de normalidad.

Además, se realizó el análisis ANOVA que permite determinar la aceptación o rechazo de la hipótesis nula, la cual establece que las medias de las poblaciones son iguales, mediante un análisis de varianza para comprobar la semejanza o diferencia de las medias. En donde se pudo observar que no existieron diferencias significativas entre los tratamientos que se muestra y por lo tanto pertenecen a una sola población y aceptación de la hipótesis nula, la cual se indica a continuación en la Tabla 11.

Tabla 12. Resultados obtenidos en la actividad antioxidante del aceite esencial del orégano

Información del factor						
Factor	Niveles	Valores				
TT	9	tratamiento 1; tratamiento 3; tratamiento 1; tratamiento 2; tratamiento 3; tratamiento 3; tratamiento 4; tratamiento 2; tratamiento 4				
Análisis de Varianza						
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p	
TT	8	5722	715,3	1,12	0,396	
Error	19	12171	640,6			
Total	27	17894				
Resumen del modelo						
S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)			
25,3101	31,98%	3,34%	*			
Medias						
TT	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%		
tratamiento 1	1	76,28	*	(23,31; 129,25)		
tratamiento 3	1	6,440	*	(-46,535; 59,415)		
tratamiento 1	6	39,3	27,4	(17,7; 61,0)		
tratamiento 2	6	30,98	18,74	(9,35; 52,61)		
tratamiento 3	5	49,6	27,4	(25,9; 73,3)		
tratamiento 3	1	71,52	*	(18,55; 124,49)		
tratamiento 4	6	54,9	27,0	(33,3; 76,6)		
tratamiento 2	1	56,76	*	(3,79; 109,73)		
tratamiento 4	1	25,81	*	(-27,16; 78,78)		

Desv.Est. agrupada = 25,3101

El análisis de Tukey permitió comparar cada una de las medias de los tratamientos para determinar la actividad antioxidante a diferentes concentraciones, del cual se obtiene como resultado que no existe una diferencia significativa, es decir, todas las medias son iguales. Resultados que también se pueden observar de una forma desglosada en la Tabla 12, donde se indica que los tratamientos pertenecen a una misma agrupación, lo que se evidencia en el análisis de Gráfica de Cajas en la Figura 13.

Tabla 13. Análisis de subconjuntos homogéneos de la actividad antioxidante

TT	N	Media	Agrupación
tratamiento 1	1	76,28	A
tratamiento 3	1	71,52	A
tratamiento 2	1	56,76	A
tratamiento 4	6	54,9	A
tratamiento 3	5	49,6	A
tratamiento 1	6	39,3	A
tratamiento 2	6	30,98	A
tratamiento 4	1	25,81	A
tratamiento 3	1	6,440	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

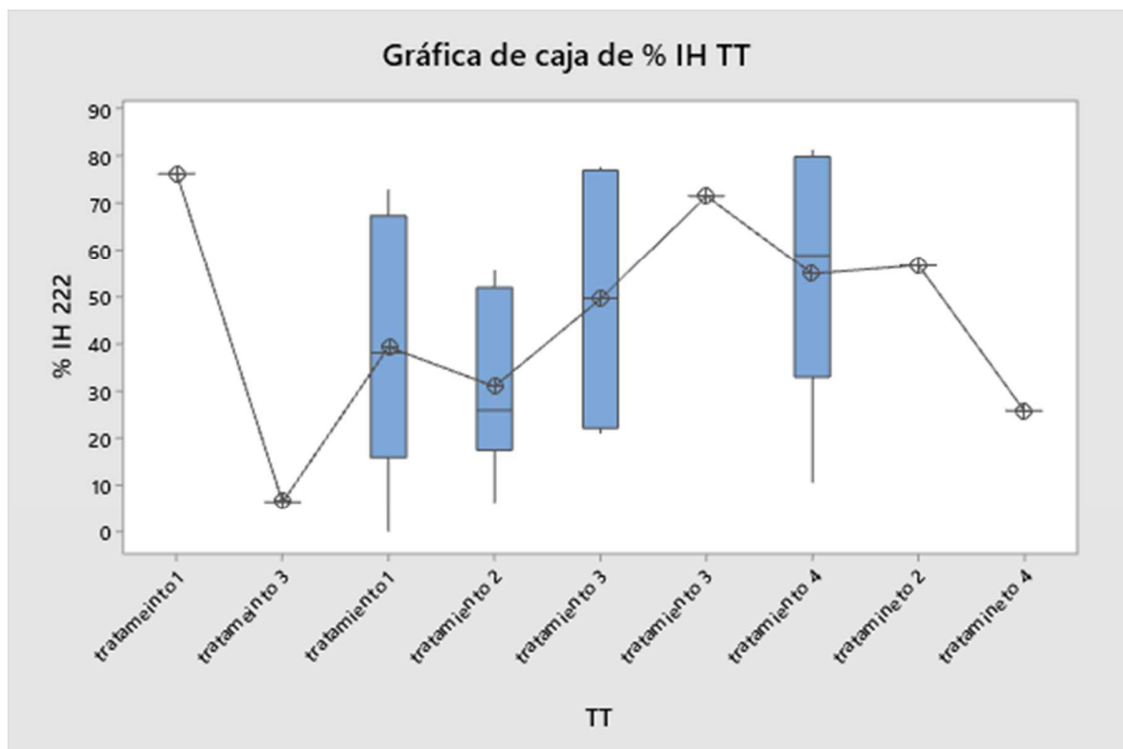


Figura 14. Gráfica de cajas de porcentaje de inhibición del aceite esencial de orégano.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

- Se determinó la actividad antioxidante del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) obtenido a partir de dos pretratamientos, los rendimientos fueron altos y variaban entre 0,053 – 0,137%. De donde se puede identificar el tratamiento T4 como el más alto, partiendo de hojas de orégano seco con ultrasonido.
- En concordancia con investigaciones anteriores, la aplicación de ultrasonido en uno de los pretratamientos a las muestras de orégano (*Origanum vulgare* L.), para su posterior caracterización físico-química, determinaron que los aceites presentaban una buena calidad y mayor rendimiento.
- Al cuantificar la cantidad de fenoles los aceites presentaron valores de 29,97 – 59,63 mg GAE*g⁻¹, observándose una mayor concentración de fenoles equivalentes a mg de ácido gálico por gramo de materia vegetal seca, en la muestra previamente sometida a ultrasonido, debido a que la homogenización fue realizada con agua, considerada el solvente universal y la molécula con alta polaridad, por lo tanto, adecuada para captar solutos polares e iónicos.
- Al determinar la actividad antioxidante del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) utilizando el método DPPH, los análisis de los resultados de actividad indican valores elevados, estableciendo el tratamiento con hojas secas y aplicación de ultrasonido la actividad antioxidante más elevada, con promedio de 50,77%.
- Según los análisis realizados se puede afirmar que mientras mayor cantidad de polifenoles presentes en el aceite esencial, más elevado es la capacidad de inhibición de radicales libres, por lo que el pretratamiento de secado y aplicación de ultrasonido se registra como el tratamiento destacado.

- Por último, por los resultados obtenidos, se concluye según la Prueba de Tukey que todas las medias son iguales, e indica que no existe una diferencia significativa entre los pretratamientos aplicados a la muestra, aunque matemáticamente, el tratamiento 4 fue considerado como el mejor en la producción de cantidad de fenoles y generación de actividad antioxidante (proceso de secado, aplicación de ultrasonido y destilación por arrastre de vapor).

RECOMENDACIONES

- Se recomienda estudiar los componentes químicos del aceite esencial de orégano antes y después de floración, debido a la composición química en el estado de la planta.
- También sería necesario evaluar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de orégano, para comprobar sus propiedades medicinales.
- Evaluar la composición química del aceite esencial obtenido mediante diferentes métodos de extracción, ya que puede variar la composición de cada aceite esencial según el solvente utilizado.
- Analizar la producción de polifenoles y la actividad antioxidante del aceite esencial en diferentes zonas del país durante un año, determinando mejor las propiedades químicas de diferentes muestras de orégano.
- Además, se recomienda mejorar los tiempos y la utilización de otros disolventes o concentraciones bajas de los mismos para aumentar los rendimientos de obtención del aceite esencial.
- Evaluar la relación carbono nitrógeno del suelo con la biosíntesis de los terpenos en aceites esenciales y su poder antioxidante

Bibliografía

- Abraham, M., Hernández, L. M., Martínez, O., & Pérez, L. (2016). Aceite esencial de orégano como potencial nutraceutico. *Investigación y desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 01(02), 453-458. Recuperado el 10 de 01 de 2020, de <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume1/2/4/78.pdf>
- Acevedo, C., Monroy, L., & Navarro, M. (2005). Composición química del aceite esencial de las hojas de toronjil (*Melissa officinalis* L.). *Información Tecnológica*, 24(4). Recuperado el 10 de 12 de 2019
- Acevedo, D., Granados, C., & Yáñez, X. (2014). Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Myrcianthes leucoxyla* de Norte de Santander. *Información Tecnológica*, 25(3), 11-16. Recuperado el 10 de 12 de 2019, de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/infotec/v25n3/art03.pdf>
- Acón, Y. (2016). *Evaluación del efecto antioxidante y antimicrobiano del orégano (Origanum vulgare) en polvo y en oleorresina y de la ostaa china (Bassica rapa var. pekinensis) en polvo, coo alternativa natural en producto cárnicos*. San José - Costa Rica: Universidad de Costa Rica. Recuperado el 10 de 12 de 2019, de <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/bitstream/123456789/3601/1/39482.pdf>
- Acosta, J. S. (2016). Empleo del ultrasonido para la extracción de fracción apolar en hojas de *Mangifera indica* L. (árbol del mango). *Rey Cubana, Plant Med*, 21(3). Recuperado el 02 de 08 de 2019
- ADEX. (2013). *Boletín agropecuario y agroindustrial*. Lima - Perú: ADEX. Recuperado el 10 de 12 de 2019, de <http://www.adexdatatrade.com/>
- Albarracín, G., & Gallo, S. (2003). *Comparaciónm de dos métodos de extracción de aceite esencial utilizando Piper Aducum (Condoncillo) procedente de la zona cafetera*. Manizales: Universidad Nacional de Colombia. Recuperado el 22 de 12 de 2019, de <http://www.bdigital.unal.edu.co/989/1/gloriacristinaalbarracinmontoya.2003.pdf>
- Amadio, C., Dediol, C., Medina, R., Miralles, S., & Zimmermann, M. (2011). Aceite esencial de orégano: un potencial aditivo alimentario. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 43(1), 237-245. Recuperado el 10 de 12 de 2019, de <https://www.redalyc.org/pdf/3828/382837648017.pdf>

- Anzaldúa, A. (1994). *La evaluación sensorial de los alimentos en teoría y práctica*. España: Acribia. Recuperado el 10 de 12 de 2019
- Arango, O., Hurtado, A., Pantoja, D., & Santacruz, L. (2012). Actividad antioxidante del aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides* H.B.K) del alto Patia. *Bioteología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 10(2), 79-86. Recuperado el 22 de 12 de 2019, de <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v10n2/v10n2a10.pdf>
- Arcila, C., Gonzáñez, E., Loarca, G., & Lecona, S. (2004). El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(1), 1-15. Recuperado el 22 de 12 de 2019, de <https://pdfs.semanticscholar.org/5580/a07288a4016982de2d5b4cce0c31809a78e5.pdf>
- Arcila, C., Loarca, G., Uribe, S., & González, E. (2004). El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *SciELO*, 54(1), 1. Recuperado el 22 de 01 de 2020, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222004000100015
- Arazola, G., Rojano, B. & Díaz, A. (2013). Capacidad antioxidante de cinco cultivares de mango (*Mangifera indica* L.) y evaluación de su comportamiento en una matriz alimentaria. Recuperado el 20 de 12 de 2019, de http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S2011-21732013000200003&script=sci_arttext&tlng=en
- Asencio, C. (2013). *Utilización de aceites esenciales de variedades de orégano como conservante antimicrobiano, y de las propiedades sensoriales de limento*. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba. Recuperado el 11 de 12 de 2019, de <https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/1692/Asencio%20-%20Utilizaci%3bn%20de%20aceites%20esenciales%20de%20variedades%20de%20or%3a9gano%20como%20conservante....pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Astudillo, S. (2014). *Utilización de aceites esenciales naturales como conservantes en la elaboración de salchichas de pollo*. Cuenca: Universidad Politécnica Salesiana. Recuperado el 12 de 11 de 2019, de <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/7009/1/UPS-CT003676.pdf>

- Asuero, A., Fett, R., Kuskoski, M., Mancini, J., & Troncoso, A. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar la actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Cien. Tecno. Aliment*, 726-732. Recuperado el 10 de 12 de 2019
- Ayala, A., Campo, J., & Gelvez, V. (2018). Ultrasonido en el procesamiento. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 16(1).
- Baptista, C., Fernández, R., & Hernández, R. (2015). *Metodología de la investigación, elementos básicos para la investigación clínica*. La Habana: Ciencias Médicas. Recuperado el 08 de 01 de 2020, de http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/bioestadistica/metodologia_de_la_investigacion_1998.pdf
- Barrera, C., & Plantas, G. (2013). Actividad antibacteriana y determinación de la composición química de los aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis*), tornillo (*Thymus vulgaris*). *Scielo*. Recuperado el 10 de 12 de 2019, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1028-47962013000200007&script=sci_arttext&tlng=en
- Bejarano, D., Ochoa, K., Paredes, L., & Silva, R. (2012). Extracción, caracterización y evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd (*Wiskataya*). *Scientia Agropecuaria*, 3, 291-302. Recuperado el 22 de 12 de 2016, de www.sci-agropecu.unitru.edu.pe
- Benedito, J., & Irianda, P. (2017). *Capacidad antimicrobiana y antioxidante de extractos de orégano, obtenidos mediante fluidos supercríticos*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia. Recuperado el 11 de 12 de 2019
- Benellic, G., Govindarajan, M., S, H., & Rajeswarya, M. (2016). Larvicidal Potential of Carvacrol and Terpinen-4-Ol from the Essential Oil of *Origanum vulgare* (Lamiaceae) Against *Anopheles stephensi*, *Anopheles subpictus*, *Culex quinquefasciatus* and *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae). *Veterinary Science*(104), 77-82. Recuperado el 10 de 12 de 2019
- Bonilla, C., Delgado, J., & Sanchez, M. (2015). *Efecto del secado y la edad de las plantas en la composición de los aceites esenciales de Lippia alba (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson y Lippia origanoides Kunth*. Palmira: Universidad Nacional de Colombia.

- Buchbauer, G., Jirovetz, L., Krastanov, A., Schmidt, E., Stoilova, I., & Stoyanova, A. (2005). Processing, analysis and application of essential oils. *Har Krishan Bhalia & Sons, Dehradun, India*, 21-23.
- Buñuelos, R., Delgadillo, L., Olivia, D., Gallegos, P., & Silva, M. (2007). Composición química y efecto antibacteriano in vitro de extractos de *larrea tridentata*, *origanum vulgare*, *artemisa ludoviciana* y *ruta graveolens* Chemical composition and antibacterian effect in vitro of four extracts. *Nova Scienta*, 9(2), 273-290. Recuperado el 10 de 12 de 2019, de <http://www.scielo.org.mx/pdf/ns/v9n19/2007-0705-ns-9-19-00273.pdf>
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *Int J. Food Microb*, 94, 223-253. Recuperado el 10 de 12 de 2019
- Cakir, A., Ala, A., Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., & Yildirim, A. (2005). Chemical of the essential oils of the flowers, leaves and stems of two *Senecio polyantheoides* Sch. Bip. Samples South Africa. *Moleculares. Agricultural and Food Chemistry*, 58, 9452-9458. Recuperado el 10 de 12 de 2019
- Campo, Y., Meneses, J., & Villada, D. (2016). Efecto del pretratamiento con ultrasonido en la extracción de pectina contenida en el Albedo del Maracuya (*Passiflora edulis*). *Scielo*, 14(01), 103-109. Recuperado el 31 de 01 de 2020, de <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v14n1/v14n1a13.pdf>
- Cardona, L., & Mejia, L. (2009). Evaluación del efecto antioxidante de aceites esenciales y extractos de *Eugenia caryphyllata*, *Origanum vulgare* y *Thimu vulgaris*. *Biosalud*, 8, 28-70. Recuperado el 10 de 12 de 2019, de <http://www.scielo.org.co/pdf/biosa/v8n1/v8n1a08.pdf>
- Carranza, J., Corona, E., Martinez, N., & Ruíz, H. (2016). Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de semillas de chia (*Salvia hispanica* L) y su actividad antioxidante. *Agrociencia*, 50(4). Recuperado el 12 de 11 de 2019
- Castanon, J. (2007). History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poult.Sci*, 86, 2466-2471. Recuperado el 10 de 12 de 2019
- Cerutti, M., & Neumayer, F. (2004). Introducción a la obtención de aceite esencial de limón. *Invenio*, 149-155. Recuperado el 06 de 01 de 2020, de

file:///C:/Users/dcdec/Downloads/Dialnet-

IntroduccionALaObtencionDeAceiteEsencialDeLimon-3331453.pdf

- Chacón, A., Cordero, G., & Pineda, M. (2009). Efecto de las condiciones de secado sobre la cinética de deshidratación de las hojas de morera (*Morus alba*). *Agronomía mesoamericana*, 20(02), 275-283.
- Chasipanta, E., & Chicaiza, T. (2016). *Evaluación de la actividad antioxidante bioautográfica de 5 variedades de aceites esenciales (Ocotea quixos, Psidium guajava, Eugenia stipitata, Piper auritum Piperimperiale)*. Quito - Ecuador: Universidad Politécnica Salesiana . Recuperado el 12 de 10 de 2019, de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/12141/1/UPS-QT09649.pdf>
- Choi, Y., H, C., Han, D. K., Kim, H., Lee, M., & Shim, S. (2010). The antioxidative properties of mustard leaf (*Brassica juncea*) kimchi extracts on refrigerated raw ground pork meat against lipid oxidation. *eat Science*, 84(3), 498-504. Recuperado el 10 de 12 de 2019
- COLPOS. (1973). *Determinación de la solubilidad en etanol de aceites esenciales y productos aromáticos*. México: COLPO9S. Recuperado el 07 de 01 de 2020, de <https://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-K-081-1976.PDF>
- Contreras, V. (2010). *Implementación a nivel de laboratorio de una unidad de extracción de volátiles por radiación de microondas*. México: Departamento de Ingenierías Química y Bioquímica. Instituto Tecnológico de Durango. Vistoria de Durango. Recuperado el 22 de 12 de 2019
- Coronel, I., & Piedra, J. (2014). *Estudio de las propiedades físicas y composición química de los aceites esenciales de las hojas de Peperomia inaequalifolia Ruiz & Pav. y Piper pubinervulum C. DC., y del rizoma de Renealmia thyrsoides subsp, thyrsoides*. Quito-Ecuador: Universidad Politécnica Salesiana. Recuperado el 16 de 01 de 2020, de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/6632/1/UPS-QT04525.pdf>
- Crado, C., & Moya, M. (2009). *Vitaminas y antioxidantes*. Madrid: Grupo Saned. Recuperado el 10 de 12 de 2019
- Dudareva, N., Pichersky, E., & Gershenzon, J. (2004). Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiol*, 135, 1893-1902. Recuperado el 10 de 12 de 2019

- Estarron, M., Flores, H., León, C., & Orozco, I. (2016). Optimización del proceso de extracción de sustancia antioxidantes a partir del orégano Mexicano (*Lippia graveolens* HBK) utilizando la metodología de superficie de respuesta. *Resaly*, 15(3), 773-785. Recuperado el 16 de 01 de 2020, de <https://www.redalyc.org/pdf/620/62048168009.pdf>
- Flores, E. (2006). *Metabolitos secundarios bioactivos de especies del género Piper de la flora boliviana*. Bolivia: Universidad de la Laguna.
- Food and Agriculture Organization y Organización Mundial de la Salud. (2005). *La necesidad de fortalecer los programas nacionales de monitoreo del uso de los antimicrobianos en medicina veterinaria en la Región. Conferencia Regional FAO/OMS sobre Inocuidad de los Alimentos para as Américas y el Caribe*. an Jose - Costa Rica: FAO - OMS. Recuperado el 10 de 12 de 2019, de <http://www.fao.org/3/a-af848s.pdf>
- Fugelsang, K., Gump, B., Nury, F., & Zoecklein, B. (2001). Capítulo 7. En K. Fugelsang, B. Gump, F. Nury, & B. Zoecklein, *Análisis y producción del vino* (págs. 121-467). España: Acribia S.A. Recuperado el 10 de 12 de 2019
- Granados, M., Santafé, G., & Yáñez, Y. (2012). Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander. *Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 10(1), 12-23. Recuperado el 22 de 12 de 2019
- Herrea, J., Kawas, J., Martíne, R., Ortega, E., Soriano, R., & Zárate, J. (2015). Uso de aceites esenciales en animales de granja. *Redalyc*, 40(11), 744-750. Recuperado el 10 de 12 de 2019, de <https://www.redalyc.org/pdf/339/33942541003.pdf>
- INEN. (2012). *Norma NTE IEN 0035. Aceites y grasas de origen animal y vegetal. Determinación de la densidad relativa*. Quito-Ecuador: Servicio Eciatoriano de Normalización.
- Javier, D. (2011). Aplicación del ultrasonido en la industria de los alimentos. *Revista Especializada en Ingeniería de Procesos en Alimentos y Biomateriales*, 6, 142-152. Recuperado el 10 de 01 de 2020, de <http://oaji.net/articles/2017/5082-1501180905.pdf>

- Larrasoña, I. (2010). *Influencia de la temperatura y tiempo de secado en la calidad de las hojas de Cymbopogon citratus D.C. STAF*. Minas Gerais - Brasil: Universidad Federal de Vicosa y Universidad Pública de Navarra. Recuperado el 06 de 01 de 2020, de <http://academica-e.unavarra.es/bitstream/handle/2454/2263/577279.pdf?sequence=1>
- Lee, K., & Shibamoto, T. (2002). Determination of antioxidant potential of volatile extracts isolated from various herbs and spices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4947-4952. Recuperado el 10 de 12 de 2019
- Martínez, A. (2001). *Aceites esenciales*. Medellín: Universidad de Antioquia. Recuperado el 22 de 12 de 2019, de http://www.med-informatica.com/OBSERVAMED/Descripciones/AceitesEsencialesUdeA_esencias2001b.pdf
- Martínez, J., Stashenko, E., & Tafurt, G. (2005). Evaluación de la actividad antioxidante de aceites esenciales en emulsiones degradadas por radiación ultravioleta. *Revista Colombiana de Química*, 34(1), 43-55. Recuperado el 10 de 12 de 2019, de <https://www.redalyc.org/pdf/3090/309026662001.pdf>
- Martínez, O. (2012). Ultrasonido y sus aplicaciones en el procesamiento de alimentos. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 13(02), 109-122. Recuperado el 31 de 01 de 2020, de <https://www.redalyc.org/pdf/813/81325441002.pdf>
- Minango, M., & Belén, N. (2017). *Aplicación de los aceites esenciales de albahaca (Ocimum basilicum), cilantro (Coriandrum sativum) y guayaba (Psidium guajava) como antioxidante*. Quito: Universidad de las Américas. Recuperado el 12 de 12 de 2019
- NMX-K395. (1972). *Método de prueba para la determinación del índice de éster en aceites y grasas vegetales y animales*. México: NMX. Recuperado el 15 de 01 de 2020, de <https://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-K-395-1972.PDF>
- Nolazco, D., & Tellez, L. (2017). Estudio de la composición química del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare* spp.) de Tacna. *Ingeniería Industrial*(35), 195-205. Recuperado el 10 de 12 de 2019, de <https://www.redalyc.org/pdf/3374/337453922010.pdf>

- Norma INEN ISO 6320. (2013). *Norma NTE INEN-ISO 6320. Aceites y grasas de origen animal y vegetal. Determinación del índice de refracción (IDT)*. Quito - Ecuador: Servicio Ecuatoriano de Normalización.
- Norma NTE INEN-ISO 660. (2013). *Norma NTE INEN-ISO 660. Aceites y grasas de origen animal y vegetal. Determinación de índice de acidez y de la acidez (IDT)*. Quito-Ecuador: Servicio Ecuatoriano de Normalización.
- Novelazco, D., & Tellez, L. (2017). Caracterización de los aceites esencial de seis ecotipos de orégano (*Origanum vulgare ssp*). *Ingeniería Industrial*(35), 195-205. Recuperado el 10 de 12 de 2019, de <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/3479/tellez-monzon-lena-asuncion.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Novelazco, D., & Tellez, L. (2017). Caracterización de los aceites esencial de seis ecotipos de orégano (*Origanum vulgare ssp*). *Ingeniería Industrial*(35), 195-205. Recuperado el 10 de 12 de 2019, de <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/3479/tellez-monzon-lena-asuncion.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- NTON. (2001). *NTON 17001-02: Norma de procedimientos para muestreo de productos vegetales*. Nicaragua: Norma Técnica Nicaraguense (NTN). Recuperado el 08 de 01 de 2020, de <http://www.fao.org/forestry/12947-09a8259bc751929ba7c7eb6c455126594.pdf>
- Ochoa, A. (2017). *Estudio comparativo de la dinámica de destilación del aceite esencial de Pimenta racemosa (Mill) J. W. Moore por los métodos de hidrodestilación e hidrodestilación asistida por microonda*. Guayaquil-Ecuador: Universidad de Guayaquil. Recuperado el 22 de 12 de 2019, de <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/20145/1/BCIEQ-T-0205%20Ochoa%20Quinatoa%20Alberto%20Steven.pdf>
- Puerta, M. (2002). *Desarrollo de un método analítico para la determinación de compuestos carbonílicos volátiles y la evaluación de la posible actividad antioxidante in vitro de algunos productos naturales y sintéticos*. Colombia: Universidad Industrial de Santander, Escuela De Química. Recuperado el 10 de 12 de 2019, de <http://hdl.handle.net/123456789/39583>

- Quispe, K., & Taco, R. (2018). *Evaluación del tiempo de extracción, factor de empaquetamiento, húmedo del rizoma, en el rendimiento de la extracción del aceite esencial de jengibre (Zingiber officinale roscoe) por arrastre de vapor, caracterización fisicoquímica del aceite esencial*. Arequipa-Perú: Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa. Recuperado el 22 de 12 de 2019
- Rodas, M. (2012). *Análisis de parámetros microbiológicos y físico-químicos de un aceite esencial de romero obtenido por medio de la destilación por arrastre de vapor*. Guatemala: Universidad Rafael Landívar. Recuperado el 16 de 01 de 2020, de <http://biblio3.url.edu.gt/Tesis/2012/02/13/Rodas-Melisa.pdf>
- Rouquaud, E., & Videla, M. (2000). Órganos de Mendoza (Argentina). *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. Argentina*, 42(1), 23-32. Recuperado el 10 de 12 de 2019
- Solís, P. (2012). *Evaluación de la actividad microbiana de los aceites esenciales de orégano (Origanum vulgare L) y tornillo (Thymus vulgris L) como potenciales bioconservadores en carne de pollo*. Riobamba: Escuela Politécnica Superior de Chimborazo. Recuperado el 10 de 12 de 2019, de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/1992>
- Torrenegra, M. (2014). *Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar extraído de especie de orégano (Origanum vulgare), orégano "borde blanco" (Origanum vulgare ssp) y oreganito (Lippia alba mill) cultivado en la zona norte del departamento de Bolívar (Colombia)*. Cartagena de Indias - Bolívar: Universidad Nacional de Colombia. Recuperado el 10 de 12 de 2019, de <http://bdigital.unal.edu.co/39674/1/45506760.2014.pdf>
- Vega, R. (2019). *Actividad antimicrobiana de aceites esenciales obtenidos por dos métodos de extracción diferentes de tres especies vegetales medicinales peruanas frente a Streptococcus Pneumoniae*. Lima.
- Wallace, R. (2004). Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proc. Nutr. Soc*, 95, 621-629. Recuperado el 10 de 12 de 2019
- World Health Organization. (2001). *Global strategy for containment of antimicrobial resistance*. Switzerland: WHO. Recuperado el 10 de 12 de 2019, de https://www.who.int/drugresistance/WHO_Global_Strategy_English.pdf

ANEXOS

Fotografías de evidencia

Fotografía N° 1. Pesaje de las hojas recolectadas



Fuente: La Autora

Fotografía N°2. Equipo utilizado para la aplicación de Ultrasonido



Fuente: La Autora

Fotografía N° 3. Equipo de extracción de aceites esenciales



Fuente: La Autora

Fotografía N° 4. Proceso de decantación de aceites esenciales



Fuente: La Autora

Fotografía N° 5. Aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*)



Fuente: La Autora

Fotografía N° 6. Determinación de aceite esencial utilizando el picnómetro



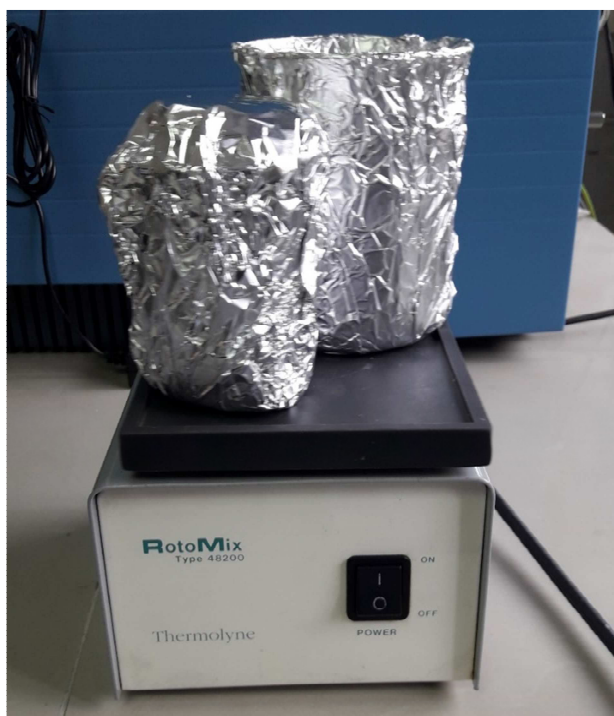
Fuente: La Autora

Fotografía N° 7. Pruebas positivas de proceso de titulación



Fuente: La Autora

Fotografía N° 8. Reposo de muestras de aceite esencial para posterior determinación de Prueba DPPH.



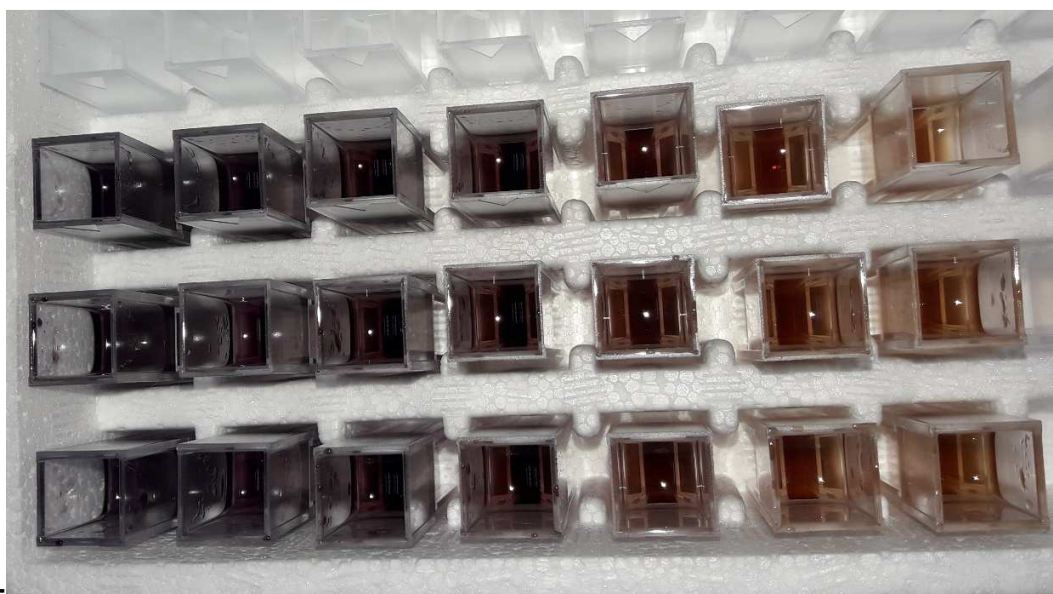
Fuente: La Autora

Fotografía N° 9. Celdas de lectura de datos en prueba de Folin Ciocalteu.



Fuente: La Autora

Fotografía N° 10. Celdas de lectura de datos en prueba DPPH.



Fuente: La Autora