

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



**DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACEITE
ESENCIAL DE ORÉGANO (*Lippia berlandieri Schauer*) SOBRE ACEITES
COMESTIBLES.**

TESIS POR:

Montserrat Vargas Negrete

Presentado como requisito parcial para obtener el título profesional de Ingeniero
en Ciencia y Tecnología de Alimentos.

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Junio 2009.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Determinación de la capacidad antioxidante del aceite de orégano (*Lippia
berlandieri Schauer*) sobre aceites comestibles.

TESIS

Presentada por:

MONTSERRAT VARGAS NEGRETE

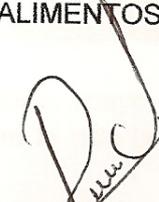
Que se somete a consideración del H. Jurado Examinador como Requisito Parcial para
Obtener el Título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

APROBADA


M.C. María Hernández González

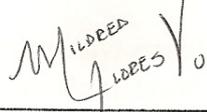
Presidente


M.C. Ramón Silva Vázquez

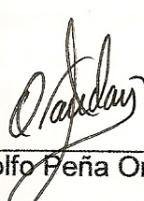
Co-asesor


M.P. Francisco Hernández Centeno

Vocal


M.C. Mildred Inna Marcela Flores Verástegui

Vocal Suplente


Ing. José Rodolfo Peña Oranday

Coordinador de la División de Ciencia Animal.

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Junio 2009.

Universidad Autónoma Agraria
"ANTONIO NARRO"



COORDINACION DE
CIENCIA ANIMAL

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada me gustaría agradecerle a mi “**Alma Terra Mater**” porque me dio una oportunidad de vida, gracias a ella tuve grandiosas experiencias, dejo sus aulas pero siempre la llevare conmigo.....

Muchas gracias **M.C. María Hernández González** porque siempre compartió sus conocimientos, experiencias, no sé qué es lo que la vida me tenga preparada pero sé que llevo buenas herramientas porque también nos enseñó a llevar una “**Calidad de vida**”, así mismo le agradezco su apoyo y confianza durante el proyecto pues me dio la oportunidad de demostrar de lo que soy capaz tanto en México como en el extranjero, fue una de las mejores experiencias que he tenido, le estaré siempre agradecida y siempre la llevaré en mi corazón...

Quiero agradecer también a los profesores que me formaron como profesionista, en especial a la **Dra. Vero, Dra. Lulú, Dr. Ramiro, M.C. Laurita, M.C. Reboloso, M.C. Heliodoro, M.C. Xochitl, M.C. Carmen Julia, M.P. Francisco y al Ing. Galván** y a cada uno de los maestros que me dieron la oportunidad de crecer profesionalmente.

Gracias a la **MC. Mildred Inna, a Dianita, y Carlitos** por su valioso apoyo, orientación, y consejos ya que me facilitaron el camino, así mismo me dieron lo más bello que puede existir que es su amistad, gracias por su tiempo y su cariño...

Al **CIRENA** (Centro de Investigación para los Recursos Naturales), por proporcionarme el material de trabajo así como por ser la institución que me abrió la puerta a la OSU en especial el **M.C. Ramón Silva Vázquez**.

Así mismo quiero agradecer a **OSU (Oklahoma State University)** por abrirme las puertas, en especial a la Ph D. Dunford que me dio la oportunidad de trabajar en su laboratorio, aprender y conocer un poco del mundo, ya que tuve la oportunidad de convivir con personas de diferentes partes del mundo; China (Aihua Su, Meizhen, Yongfem, Dan), Iraq (**Shaymaa A.**), Corea (Dr. Chang), Indonesia (Vania, Wanda), Estados Unidos (Jerad, Angie, Richelle), Turquía (Dra. Dunford). Y me di cuenta que lo único que tenemos que hacer para crecer y poder competir a nivel mundial es luchar, prepararse día a día y dar un poco más de lo que esperan.

Por último me gustaría agradecer al Dr. Aguinaldo Ernesto García Santos y a su señora esposa Margarita Ramos de García, por su gran ayuda al entrar a esta institución, siempre les estaré agradecida.

iiiiiiiiiiiiii**GRACIAS!!!!!!!!!!!!**

DEDICATORIAS

Dicen que las personas solo estamos de paso pero gracias a ustedes mi camino por esta vida ha sido maravilloso...

Antes que nada le quiero dar gracias a **DIOS** por darme unos padres y una hermosa familia, por darme salud, paz, fe y mucho amor.....

Gracias a mi familia por su apoyo y amor incondicional, **Ing. Crispin Vargas Rojas, Norma Angélica Negrete Suárez, Orlando y Christal Vargas Negrete.**

“Cuando me sentía morir, solo pensaba en ustedes, me tranquilizaba, respiraba profundo y comenzaba de nuevo”.

PAPÁ:

Gracias, porque siempre me enseñaste con el ejemplo, que ningún sueño es imposible siempre y cuando estemos dispuestos a luchar, y dar lo mejor de nosotros, siempre has luchado para que nunca nos falte nada y seamos felices, y siempre nos has apoyado cuando más lo necesitamos, sabes que yo estoy muy orgullosa de ser tu hija porque tú eres un gran hombre, **TQM.....** y con nada podré pagarte todo lo que has hecho por mí, éste logro es también tuyo...

MAMÁ:

Hola MA, solo quiero que sepas que eres todo para mí, que esta etapa la culminé gracias a ti, porque nunca dejaste de creer en mí, apoyarme y estar conmigo porque cuando me sentía sola siempre estabas ahí escuchando dándome consejos y abrazándome **TQM**, y no sé cómo pagarte todo lo que has hecho, para mí eres la mujer más maravillosa del mundo, porque a pesar de todo nunca has bajado la guardia y nunca has dejado de luchar con nosotros y por nosotros, porque has dejado de luchar por tus sueños por estar apoyándonos, muchas gracias Ma, este primer logro es también tuyo, tu siempre pusiste tu corazón y fe en mi.....

PAICK:

Sabes creo que mi mayor sacrificio ha sido estar lejos de ti, eres el mejor amigo y hermano, quiero darte las gracias por tu apoyo y confianza. Desde hace casi 3 años comenzaste a luchar por los tuyos y estoy muy orgullosa en lo que te has convertido, en un gran hombre, realmente te admiro mucho y me gustaría ser como tú. Gracias **Janet**, por hacer tan feliz a mi hermano, por ser mi amiga y siempre darme fuerza, **TQM** y sé que la vida les tiene preparado cosas maravillosas, nunca dejen de luchar, sé que aunque muchas veces las cosas son difíciles, el **AMOR**, cariño, paciencia y la lucha, son el mejor motor para seguir adelante.

CHRIS:

Eres una gran mujer y una buena hermana, tienes muchas cosas hermosas y un gran potencial, quiero que siempre seas feliz y que nunca dejes de luchar por tus sueños porque nada es imposible, me duele estar lejos de ti, pero sabes siempre estás conmigo TQM. **Carlos** sé que siempre lucharas por mi hermana y por que sea feliz...

Zua Vargas García, Angélica Christina Rodríguez Vargas:

Hola muñecas preciosas, se que aún están chiquitas y bueno no saben leer y tal vez ahora no comprendan estas palabras, pero saben ustedes son mi motor para seguir adelante, son esa luz que ilumina mi vida y que me roba una sonrisa, me duele mucho estar lejos de ustedes y no verlas crecer pero sé que vale la pena este sacrificio, solo quiero que sepan que siempre estaré y velaré por ustedes porque son mis princesitas.

A mi Abue Gloria: La quiero mucho y aunque no estoy con usted siempre la llevo en mi corazón..

A mi Abue Julia: Hola abue, sabe solo quiero que sepa que la quiero muchisisisimo y que siempre está presente en mi, que la extraño mucho pero la siento cerca de mí, creo que soy así por usted, porque mi ma es maravillosa así como usted...

Tía Juli, Lupita: Las quiero mucho, les agradezco de corazón su apoyo, consejo, tiempo, paciencia pero sobre todo el amor que me tienen, siempre han sido incondicionales para mí....

A mi familia en Toluca y D.F., aunque no los vea, siempre están cerca de mí, los quiero mucho y la verdad los extraño, gracias por ser y formar parte de mi vida, por quererme tanto y por darme tanta fuerza....

Corina:

Hola bruja, somos amigas desde hace cuanto? La verdad es que ya hasta perdí la cuenta, no es cierto aún llevo la cuenta. Recuerdo cuando me venía a Saltillo, lloramos durante varios días porque pensamos que nos íbamos a alejar, pero la verdad es que nos hemos unido más, eres una hermana para mí y te agradezco todo tu apoyo, cariño y sinceridad siempre has estado conmigo en las buenas y en las malas, agradezco de todo corazón que seas mi mejor amiga TQM.....

Antonio Mejía López, Leticia Pablo Valencia, Adolfo Vallejo Betán:

Ustedes son y fueron mi segunda familia, sé que se puede tener una familia sin ser de la misma sangre, fuimos y seremos los cuatro fantásticos, no importa el lugar donde vayamos siempre seremos **A.L.M.A.** Gracias de todo corazón por su apoyo, consejos,

paciencia, sinceridad, pero sobre todo por su linda, incondicional y sincera amistad, así como por su cariño, los quiero mucho y son mis mejores amigos siempre los llevaré en mi corazón y pensamientos...

Ing. José Rodríguez: Además de ser mi entrenador, fue mi amigo, mi papá, mi guía, le quiero agradecer de todo corazón todo lo que hizo por mí, pertenecer al equipo fue mi mayor logro, tener otro padre, mi mayor satisfacción. Gracias por ayudarme a ser una mejor persona...

A mis amigos: Marilú Pluma, Juan José Hernández, Aglael Castro, María de Jesús, Maira, Tete, Fredy E. Balón, Nayeli Robles, Esmeralda, Luis A. (Keko), Humberto (Chillón), Rubí Galván, Magali, Kenia, Boni, Betsy, Roberto Carlos, Gabi Morales, Gisela, Panchito, Peter, Pepe Toño, Iris, Amalia, Armando Ariel Becvort Azcurra, gracias por su amistad y cariño, siempre tendrán un lugar en mi corazón...

Al equipo de Atletismo:

Florencio Espínola, Gerardo Espínola, David García, Oscar Munive, Marquito Basaldúa, Marco Carrasco, Celso, Juanito; compartimos grandiosas experiencias, sufrimos nuestros triunfos, pero sobre todo luchamos cada día, porque nuestro pasatiempo nos ayudó a darnos cuenta de lo que somos capaces de hacer, nos puso al límite, pero sobre todo me dejó unos grandes AMIGOS, los voy a extrañar pero a donde quiera que vaya siempre los voy a recordar... GRACIAS.....

A mis amigos mexicanos y extranjeros que conocí en la OSU, gracias porque sin conocerme me dieron la mano y su amistad, las fronteras solo son distancia en kilómetros, pero para el corazón no existen eso: Karla del Rio, Luis Alberto Ordóñez, Lupita Fabregas, Enrique y Belinda Sánchez, Dunford Nurhan, Dra. Ma. De Lourdes Reyes, Guadalupe Dávila, Pili, Lorna, Vittorio, Aihua Su, Meizhen, Yongfem, Shayma, Dr. Chang, Vania, Wanda, Dan, Kelly...

A mi amigo incondicional **Antonio Contreras**, gracias por tu linda amistad, TQM..

Gali: eres un niño muy lindo TQM, gracias por estar siempre cerca de mi familia...

Gracias a todas las personas que han dejado huella en mi corazón: Areli, Oscar Quinto, Nallely Tovar, Maribel Ríos, Yadira Ivette, Zarái Mercado, Ricardo S, Rebeca Flores, Gloria Flores, David R, Rosa S, Vanessa, Filiberto, que a pesar de los años la amistad sigue..

A las familias: **Familia Bucio, Familia Yamada, Familia Muñoz, Familia Islas, Familia Gutiérrez, Familia Ordoñez, Familia Negrete Suárez**, por siempre estar tan cerca.....

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIAS.....	iv
INDICE GENERAL	vii
INDICE DE FIGURAS	11
INDICE DE TABLAS.....	13
CAPÍTULO I	
RESUMEN	14
CAPÍTULO II	
INTRODUCCIÓN	15
CAPÍTULO III	
OBJETIVOS.....	17
Hipótesis	17
CAPÍTULO IV	
MARCO TEÓRICO	18
4.1 LÍPIDOS.....	18
4.1.1 Clasificación de los lípidos.....	18
4.1.2 Grasas y aceites.....	19
4.1.2.1 Características de aceites y grasas comestibles	19
4.1.2.2 Estructura de las grasas y aceites.....	19
4.1.2.3 Fuentes de aceites y grasas	21
4.1.2.3.1 Aceite de soya (<i>Glycine max</i>).....	21
4.1.2.3.2 Aceite de Maíz (<i>Zea mays L.</i>).....	21
4.1.2.3.3 Aceite de girasol (<i>Helianthus annus L.</i>).....	21
4.1.2.3.4 Aceite de canola (<i>Brassica napus</i>).....	22
4.1.2.3.5 Semilla de algodón (<i>Gossypium hitsatum L.</i>).....	22
4.1.2.3.6 Aceite de oliva (<i>Olea europea</i>).....	22
4.1.2.3.7 Aceite de pescado.....	22

4.2 DETERIORO DE LOS LÍPIDOS	23
4.2.1 Hidrólisis	23
4.2.2 Rancidez oxidativa	24
4.2.3 Polimerización y/o rancidez por absorción	27
4.2.4 Determinación de la estabilidad de una grasa en producto terminado.....	27
4.2.4.1. Método del oxígeno activo (MOA)	27
4.2.4.2. Índice de peróxidos	27
4.2.4.3. Índice de acidez	28
4.2.4.4. Caracterización de ácidos grasos por cromatografía gaseosa	28
4.3 ANTIOXIDANTES	28
4.3.1 Clasificación	30
4.3.1.1 Antioxidantes sintéticos.....	30
4.3.1.1.1 Esteres del ácido gálico	30
4.3.1.1.2 E-320 Butil hidroxianisol (BHA)	31
4.3.1.1.3 E-321 Butil hidroxitolueno (BHT)	32
4.3.1.1.4 Ter-Butilhidroquinona (TBHQ).....	32
4.3.1.2 Antioxidantes naturales.....	33
4.3.1.2.1 Compuestos fenólicos.....	33
4.3.1.2.2 Flavonoides	33
4.3.1.2.3 E-306/E-309 Tocoferoles	34
4.3.1.2.4 Ácido dihidrolipoico (DHHLA)	34
4.3.1.2.5 Aceites esenciales.....	34
4.3.1.2.5.1 Extracto de romero.....	35
4.4 ORÉGANO (<i>Lippia berlandieri Schauer</i>)	35
4.4.1. Generalidades del orégano.....	35
4.4.2 Características botánicas.....	36
4.4.3 Clasificación taxonómica.....	36
4.4.4 Clima y suelo	37

4.4.5 Composición química	37
4.4.6 Definición de aceite esencial	38
4.4.6.1 Método de extracción	38
4.4.6.2 Principales elementos químicos del aceite esencial de orégano.....	39
CAPÍTULO V	
MATERIALES Y MÉTODOS	41
5.1 LOCALIZACIÓN DEL SITIO EXPERIMENTAL	41
5.2 MATERIAL Y EQUIPO DE LABORATORIO	41
5.2.1 Material	41
5.2.2 Equipo	41
5.3 METODOLOGÍA.....	42
5.3.1 ETAPA I. COMPONENTES DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO.....	42
5.3.1.1 Caracterización del aceite esencial de orégano.....	42
5.3.1.2 Polifenoles totales	42
5.3.1.3 Estabilidad oxidativa (método Rancimat)	42
5.3.3 ETAPA II.RANCIDEZ HIDROLÍTICA Y OXIDATIVA.....	43
5.3.2.1 Rancidez hidrolítica.....	43
5.3.2.2 Rancidez oxidativa	43
5.3.3 ETAPA III. DETERMINACIÓN DE ANTIOXIDANTES	43
5.3.3.1 Capacidad secuestrante del radical estable DPPH.....	43
5.3.3.2 Capacidad de Absorción del Radical Oxígeno (ORAC).....	44
CAPÍTULO VI	
RESULTADOS Y DISCUSIONES	45
6.1. ETAPA I COMPONENTES DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO.....	45
6.1.1 Caracterización del aceite esencial de orégano.....	45
6.1.2 Polifenoles totales	47
6.1.3 Estabilidad oxidativa método Rancimat.....	47
6.2 ETAPA II RANCIDEZ HIDROLÍTICA Y OXIDATIVA.....	51

6.2.1 Rancidez oxidativa	51
6.2.2 Rancidez hidrolítica.....	51
6.3 ETAPA III DETERMINACIÓN DE ANTIOXIDANTES	56
6.3.1 DPPH.....	56
6.3.2 ORAC (Oxygen Radical Absorption Capacity)	58
CAPÍTULO VII	
CONCLUSIONES	60
RECOMENDACIONES.....	61
CAPÍTULO VIII	
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
ANEXO I	65
A. Metodología para la extracción del antioxidante Terbutil hidroxi-quinona (TBHQ) del aceite de canola marca capullo	65
B. Metodología para la determinación de antioxidantes por el método: Capacidad secuestrante del radical estable DPPH siguiendo la técnica OSU, FAPC: Food and Agricultural Products Center, 2008.	67
C. Determinación de antioxidantes por el método Capacidad de absorción de radicales libre de oxígeno (ORAC), siguiendo la metodología OSU, FAPC 314, Fruit & Vegetable Products Lab, elaborado y modificado por: Yannis Oikonomakos, 2008.....	68
ANEXO II	69
Gráficas de estabilidad oxidativa (método Rancimat)	69
ANEXO III	73
Tablas de análisis de varianza T-Student.....	73

INDICE DE FIGURAS

1. Estructura del glicerol.....	20
2. Estructura del triglicérido.....	20
3. Reacción de hidrólisis	24
4. Reacción de oxidación	24
5. Reacción de inducción.....	26
6. Reacción de propagación	26
7. Estructura del galato.....	31
8. Estructura del Butil hidroxianisol.....	31
9. Estructura del Butil hidroxitolueno	32
10. Estructura de la Ter-Butil hidroxiquinona.....	33
11. <i>Lippia berlandieri</i>	36
12. Estructura química de los principales componentes del orégano.....	38
13. Sistema de arrastre por vapor.....	39
14. Principales componentes del aceite esencial de orégano	39
15. Cromatograma del aceite esencial de orégano.....	45
16. Estabilidad oxidativa.....	49
17. Estabilidad oxidativa fracción Carvacrol	50
18. Índice de peróxidos del aceite de canola con antioxidante y sin antioxidante	51
19. Índice de acidez del aceite de canola con y sin antioxidante.....	52
20. Índice de acidez de la fracción Timol-Carvacrol.....	53
21. Índice de acidez de la fracción Carvacrol.....	54
22. Índice de acidez de la fracción Timol.....	55
23. Índice de acidez de las fracciones Timol-Carvacrol, Timol y Carvacrol.....	56

24. Gráfica de absorción del DPPH por las fracciones del aceite esencial de orégano y por el BHT	57
25. Porcentaje de inhibición antioxidante	58
26. Capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC).....	59

INDICE DE TABLAS

1. Ventajas y desventajas de los antioxidantes naturales y sintéticos.....	30
2. Taxonomía del orégano	37
3. Porcentaje de componentes en el aceite esencial de orégano.....	46
4. Compuestos en el aceite de orégano detectados mediante cromatografía de gases....	46
5. Contenido de compuestos fenólicos en las fracciones del aceite esencial de orégano y antioxidante comercial BHA.....	47
6. Tiempo de inducción del aceite de pescado adicionado con las fracciones del aceite esencial de orégano	48

CAPÍTULO I

RESUMEN

Los aceites son utilizados para la elaboración de alimentos y sufren un proceso de deterioro llamado rancidez, el cual se ve acelerado por la luz, el oxígeno del aire y altas temperaturas principalmente; tal proceso puede retrasarse con el uso de antioxidantes.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad antioxidante del aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri* Shauer) aplicado a aceites comestibles, para tal estudio se utilizó aceite de canola y aceite de pescado puro. El presente estudio se realizó en diferentes etapas: se determinó el tiempo de inducción del aceite de pescado solo, así como adicionado con las fracciones Timol-Carvacrol, Timol y Carvacrol a concentraciones 0.01, 0.2, 0.4, 0.6%, se calculó el índice de acidez y peróxidos del aceite de canola con y sin antioxidante con la aplicación de luz ultravioleta 2 minutos cada 20 minutos haciendo los monitoreos a las 0, 4,5,6,10,12,14,16,18,22,24 hrs, así mismo se midió el índice de acidez del aceite de canola con y sin antioxidante comercial y adicionado con las 3 fracciones del aceite de orégano a concentraciones de 0.01, 0.02, 0.04, 0.05 y 0.1% a temperatura de 100 °C con monitoreo a las 0,8,24,32,48 y 56 hrs, las observaciones se hicieron por duplicado.

Se obtuvo el contenido de fenoles totales, de acuerdo al método de Folin-Ciocalteu, se evaluó la capacidad antioxidante por los métodos: Capacidad de Absorción de Radicales Libres de Oxígeno (ORAC), Capacidad secuestrante del radical estable DPPH.

Los resultados mostraron que el aceite esencial de orégano tiene propiedades antioxidantes. En el aceite de pescado la fracción Timol al 0.6% mostró un mejor efecto, en el aceite de canola las tres fracciones mostraron actuar como antioxidantes a una concentración de 0.01 y 0.02%. La fracción Timol tuvo mayor efecto contra el radical DPPH, y la fracción Timol-Carvacrol con el antiradical AAPH.

Palabras claves: orégano, aceite esencial, antioxidante, aceite comestible, rancidez hidrolítica, rancidez oxidativa.

CAPÍTULO II

INTRODUCCIÓN

Existe una gran variedad de aceites vegetales utilizados para el procesamiento de alimentos, dentro de los que se encuentran el de soya, girasol, maíz, oliva, algodón, palma, entre otros.

Los aceites están compuestos por lípidos, los cuales son mezclas de triglicéridos, que son la combinación de tres ácidos grasos con una molécula de glicerol, los cuales sufren procesos de deterioro, dentro de los que se encuentran: hidrólisis, autooxidación, reversión y la polimerización.

De todos los fenómenos mencionados el más problemático en la industria alimentaria es la autooxidación de los lípidos, la cual puede llegar a retrasarse con ayuda de los antioxidantes alimentarios.

La mayoría de productos grasos tienen sus propios antioxidantes naturales, aunque muchas veces éstos se pierden durante el proceso industrial y han de ser aportados de nuevo.

Los antioxidantes pueden actuar por medio de diferentes mecanismos ya sea deteniendo la reacción en cadena de la oxidación de las grasas, eliminando el oxígeno atrapado o disuelto en el producto, o eliminando las trazas de cierto metales, como el cobre o el hierro, que facilitan la oxidación.

Los antioxidantes frenan la reacción de oxidación, pero a costa de inactivarse ellos mismos. El resultado es que la utilización de antioxidantes retrasa la alteración oxidativa del alimento, pero no la evita de una forma definitiva (Cubero et. al., 2002).

Los antioxidantes son de dos tipos: naturales y artificiales siendo estos últimos los más utilizados debido a su bajo costo.

Dentro de los antioxidantes artificiales más utilizados en grasas y aceites se encuentran el Butil hidroxianisol (BHA), Butil hidroxitoluol (BHT), Ter-butilhidroxiquinona (TBHQ), tocoferoles. Dentro de los antioxidantes naturales se pueden citar los aceites

esenciales que son metabolitos secundarios de las plantas, en los cuales pueden encontrarse hidrocarburos alicíclicos y aromáticos, así como sus derivados (alcoholes, aldehídos, cetonas y ésteres).

Del aceite esencial de orégano, el cual es extraído por destilación con arrastre de vapor, se han logrado determinar hasta 56 compuestos, de entre los cuales, los que se encuentran en mayor proporción están el timol y el carvacrol.

Morales (2005), menciona que una de las principales actividades biológicas del orégano es su capacidad antioxidante, debido a eso se realizó el presente estudio para conocer si el aceite esencial de orégano ejerce una capacidad antioxidante en aceites comestibles, así como para conocer que fracción es la que tiene mejor actividad inhibitoria.

CAPÍTULO III

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad antioxidante del aceite esencial de orégano en aceites comestibles.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar los componentes del aceite esencial de orégano.
- Comparar la efectividad de la actividad antioxidante ejercida por las fracciones Timol-Carvacrol, Timol y Carvacrol del aceite esencial de orégano, contra el antioxidante comercial Butil hidroxitolueno (BHT)
- Determinar la capacidad inhibitoria de la rancidez oxidativa e hidrolítica ejercida por las diferentes concentraciones de cada fracción del aceite esencial de orégano en aceite de canola y pescado.
- Establecer la fracción y concentración óptima del aceite esencial de orégano para inhibir el deterioro del aceite de canola y aceite de pescado.

HIPÓTESIS

Las diferentes fracciones del aceite esencial de orégano actúan como antioxidantes en aceites de canola y pescado.

CAPÍTULO IV

MARCO TEÓRICO

4.1 LÍPIDOS

La palabra lípido proviene del griego *lipos*, que significa grasa (Badui, 1999).

Lehninger, (1995) menciona que los lípidos son biomoléculas orgánicas insolubles en el agua, que pueden extraerse de las células y de los tejidos mediante solventes no polares. Existiendo así diferentes clases pero sus propiedades distintivas derivan de su estructura.

El término “lípidos” incluye a los triglicéridos, esteroides (incluido el colesterol) fosfatidos, monoglicéridos, diglicéridos ácidos grasos libres, alcoholes grasos, ceras, terpenos, vitaminas liposolubles y otros productos (Lawson, 1994).

Las grasas se componen de tres elementos químicos: carbono, hidrógeno y oxígeno, y contienen proporciones menores de oxígeno que el que contienen los carbohidratos (Badui, 1999).

4.1.1 Clasificación de los lípidos

La clasificación de los lípidos está basada en algunas de las propiedades físicas o químicas que los caracterizan, Badui, (1999) menciona que lo más común es dividirlos en tres grandes grupos en función a su estructura química.

1. Lípidos simples. Ésteres de ácidos grasos y alcoholes
 - a) Grasas y aceites. Ésteres de glicerol con ácidos monocarboxílicos
 - b) Ceras. Ésteres de alcoholes monohidroxilados y ácidos grasos
2. Lípidos compuestos. Lípidos simples conjugados con moléculas no lipídicas
 - a) Fosfolípidos. Ésteres que contienen ácido fosfórico en lugar de un ácido graso, combinado con una base de nitrógeno.
 - b) Glucolípidos. Compuestos de carbohidratos, ácidos grasos y esfingosinol, llamados también cerebrósidos.
 - c) Lipoproteínas. Compuestos de lípidos y proteínas.

3. Compuestos asociados.
 - a) Ácidos grasos (derivados de los lípidos simples)
 - b) Pigmentos
 - c) Vitaminas liposolubles

4.1.2 Grasas y aceites

Las grasas y los aceites son los principales lípidos que se encuentran en los alimentos contribuyendo así a la textura y en general a las propiedades sensoriales del producto. Las principales fuentes son los tejidos animales y las semillas oleaginosas (Badui, 1999). Denominándose así grasa cuando se encuentra sólida o semisólida a temperatura ambiente entre los 21.1 y 23.9^oC, y aceite cuando se encuentra en estado líquido a estas temperaturas y a otras inferiores.

Los aceites se usan para la elaboración de alimentos y sirven como transportadores de vitaminas solubles en grasas (como la vitamina A, D y E), ácidos grasos específicos, antioxidantes e ingredientes nutricionales liposolubles que pueden fortificar los alimentos, además de aportar 9 Kcal por gramo, y ácidos grasos esenciales.

4.1.2.1 Características de aceites y grasas comestibles

Los aceites deben tener un aspecto limpio y transparente a temperatura ambiente, olor y sabor agradable, con aromas propios y característicos a los frutos o semillas de los que procedan.

AMV, (1988) menciona que las características químicas son: humedad y materiales volátiles, en estufa a 105^oC no superior a 0.1 por 100. Impurezas insolubles en el éter de petróleo, calculadas sobre grasa seca, no superior a 0.5 por 100. Acidez libre, expresada en ácido oleico y referida a grasa seca, no superior a 3 por 100 para los aceites vírgenes de oliva y cacahuete, y no superior a 0.5 por 100 para aceites y grasas refinados.

4.1.2.2 Estructura de las grasas y aceites

Los aceites y las grasas son mezclas de triglicéridos; es decir, están formados por tres moléculas de ácidos grasos, unidos a una molécula de glicerol (figura 1).

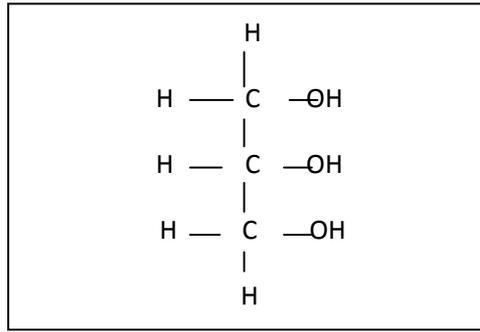


Figura 1. Estructura del glicerol (Lawson, 1999)

La molécula de glicerol está compuesta por tres átomos de carbono, cinco hidrógenos y tres grupos hidroxilo. Cuando se combinan tres ácidos grasos con una molécula de glicerol se obtiene un triglicérido como se observa en la figura 2.

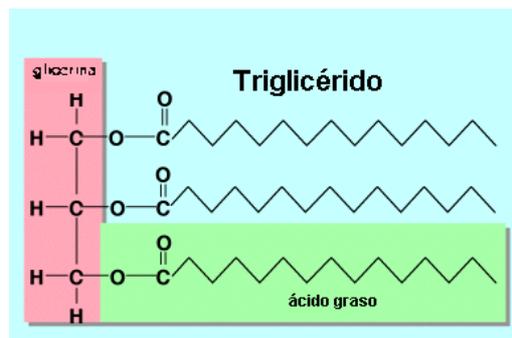


Figura 2. Estructura de un triglicérido

Las diferencias de estabilidad, comportamiento, plasticidad, estado físico, patrón de cristalización, índice de yodo y temperatura de solidificación de las grasas y los aceites se deben fundamentalmente a la presencia y a la concentración de los ácidos grasos constituyentes (Badui, 1999).

Los ácidos grasos pueden ser saturados o insaturados, los primeros son aquellos que tienen una sola ligadura entre los átomos de carbono, y no tienen la capacidad de captar hidrógeno. Están constituidos por ácidos grasos de cuatro hasta veinticuatro átomos de carbono, son mucho más estables a los diversos mecanismos de deterioro de las grasas que los insaturados.

Los ácidos grasos insaturados tienen una gran reactividad química y están propensos a transformaciones de isomerización y oxidativas, debido al doble enlace que presentan en su estructura, ya que tienen la capacidad de fijar hidrógeno u otros elementos en este doble enlace, son abundantes en aceites vegetales y marinos.

Cualquier ácido graso no unido a glicerol o a algunas moléculas en un aceite o grasa se denomina "ácido graso libre". La mayoría de los aceites no refinados contienen cantidades relativamente elevadas de ácidos grasos libres. Los aceites y grasas refinados que están listos para el uso en alimentos tienen habitualmente un nivel de ácidos grasos inferiores al 0.05% (Lawson, 1999).

4.1.2.3 Fuentes de aceites y grasas

Existen numerosas fuentes de aceites y grasas, pudiendo ser de origen animal o vegetal. Dentro de los aceites de origen vegetal se tienen los de soya, coco, canola, semilla de algodón y de maíz, en las de origen animal se cuenta con: manteca de cerdo, el sebo comestible, la grasa de la leche y aceites de origen marino.

4.1.2.3.1 Aceite de soya (*Glycine max*)

Este aceite se obtiene a partir de las semillas de la soya. Los usos más importantes son en la elaboración de frituras, aceites para cocina y ensaladas.

4.1.2.3.2 Aceite de maíz (*Zea mays L.*)

La mayoría del aceite de maíz producido, es un subproducto de la obtención del almidón de maíz, siendo una de las principales atracciones su elevado contenido de ácidos grasos poliinsaturados, alrededor del 55% (Lawson, 1999).

El aceite de maíz posee un excelente sabor, es una fuente concentrada de ácidos grasos esenciales, posee vitamina E y tiene un alto porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados, y es relativamente estable por contener niveles elevados de antioxidantes naturales.

4.1.2.3.3 Aceite de girasol (*Helianthus annus L.*)

El aceite de girasol constituye el principal producto, siendo una planta de cultivo sencillo, y siendo considerado entre los mejores aceites vegetales.

Contiene alrededor del 90% de ácidos grasos insaturados, del cual un 55-60% son poliinsaturados y un 30% monoinsaturados.

4.1.2.3.4 Aceite de canola (*Brassica napus*)

Lawson, (1999) menciona que el aceite de canola proviene del mismo tipo de planta que el aceite de colza y tiene un buen crecimiento en climas fríos, siendo de importante consumo en países como Canadá, Rusia y Finlandia

El aceite de canola se utiliza en la fabricación de aceites de mesa y cocina, y en la industria de alimentos preparados, (Avalos, 2003). La clave de la aceptación de la canola es su bajo contenido en ácidos grasos saturados.

4.1.2.3.5 Aceite de semilla de algodón (*Gossypium hitsatum L.*)

El aceite es un subproducto y su producción depende de la utilización de algodón en la industria textil (Lawson, 1999), tiene un olor y sabor fuerte, el cual se debe de procesar para poder obtener un sabor más suave y color más claro, teniendo como consecuencia la destrucción de sus antioxidantes naturales.

4.1.2.3.6 Aceite de oliva (*Olea europea*)

Es muy importante en el cocinado y preparación de ensaladas.

Es un aceite que no ha sido deodorizado para eliminar los elementos naturales del aroma, los cuales son deseables. Contiene alrededor del 71% de ácido oléico. Está constituido sobre todo por ácidos grasos insaturados.

4.1.2.3.7 Aceites de pescado

Consisten en una mezcla de triglicéridos de ácidos grasos, de longitudes variadas. Los aceites de origen marino, tienen como característica que cuentan con una alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga con cinco o seis dobles enlaces, haciéndolos más inestables y más fáciles de incorporar moléculas de hidrógeno, oxígeno u otros entre éstos.

4.2 DETERIORO DE LOS LÍPIDOS

Las grasas y los aceites sufren diferentes transformaciones, que reducen el valor nutritivo del alimento y producen compuestos volátiles que imparten olor y sabor desagradable denominado rancidez. Este deterioro puede tener lugar bajo condiciones de exposición al calor, a la luz, al oxígeno y a otros agentes. Esto se debe a que el enlace éster de los acilglicéridos es susceptible a la hidrólisis química y enzimática, y a que los ácidos grasos insaturados son sensibles a reacciones de oxidación y pueden ser alterados a diferentes niveles.

Badui, (1999) menciona que el término rancidez se emplea para describir los diferentes mecanismos a través de los cuales se alteran los lípidos y se ha dividido en: rancidez hidrolítica, rancidez oxidativa, y rancidez por absorción; la primera se debe a la acción del agua sobre un aceite, la segunda se refiere a la acción del oxígeno y de las lipoxigenasas sobre las insaturaciones de los ácidos grasos, mientras que la rancidez por absorción da lugar a estructuras cíclicas.

4.2.1 Hidrólisis

Es la reacción del agua con una grasa o aceite, se lleva a cabo en la unión entre los ácidos grasos y la porción del glicerol, se traduce en la separación de algunos de los ácidos grasos a partir del aceite o de la grasa, dando lugar a ácidos grasos libres.

Es un tipo de deterioro que es importante en las grasas con ácidos grasos de cadena corta y que se percibe por la aparición del típico sabor a jabón como lo menciona Cubero *et. al.* (2002), los ácidos grasos liberados, son poco volátiles y por lo tanto no se percibe por el olfato; su presencia sólo se puede advertir mediante la determinación del índice de acidez y de otras características Badui (1999), en la figura 3 se muestra la reacción de hidrólisis.

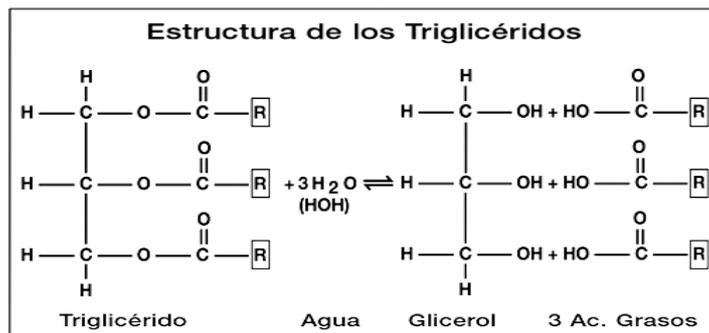


Figura 3. Reacción de Hidrólisis

La hidrólisis es catalizada por las altas temperaturas, presiones y una excesiva cantidad de agua. Avalos, (2003) menciona que esta reacción requiere de especial atención cuando los alimentos son fritos, ya que la excesiva cantidad de agua puede acelerar la generación de ácidos grasos libres, produciendo una gran cantidad de humo y afectar al sabor del alimento frito.

4.2.2 Rancidez oxidativa

Las reacciones de oxidación de lípidos tienen diversos orígenes, el principal consiste en la reacción del oxígeno en los dobles enlaces o puntos de insaturación de los ácidos grasos como se observa en la figura 4.

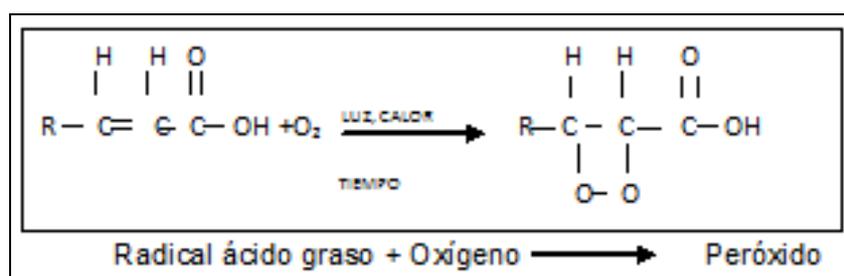


Figura 4. Reacción de oxidación

Lawson, (1999) menciona que es la reacción de un aceite o grasa con el oxígeno del aire, generalmente es un proceso lento; necesita un tiempo considerable para producir una cantidad suficiente de peróxidos (principales productos iniciales de la autooxidación)

para desarrollar sabores u olores desagradables, afectando negativamente el sabor. Se favorece a medida que se incrementa la concentración de ácidos grasos insaturados

La velocidad de oxidación se acelera con un incremento en la temperatura, especialmente por encima de 60°C la velocidad se duplica por cada 15°C de aumento; con la exposición al oxígeno del aire, presencia de luz y contacto con materiales considerados como pro-oxidantes, por ejemplo el cobre y el hierro, inician esta transformación en concentraciones menores a 1 parte por millón. Los ácidos grasos libres solubilizan estos iones y facilitan su acción catalizadora, ya que provocan un mayor contacto con el lípido.

La reacción de autooxidación tiene lugar mediante una serie de reacciones en cadena, provocando una alteración y degradación organoléptica como: pérdida de aroma y sabor característico, desarrollo de otros aromas y sabores típicos de la rancidez, decoloración de los pigmentos y aparición de sustancias coloreadas no deseables, cambios en la textura, pérdida del valor nutricional por destrucción de vitaminas A, D, E y ácidos grasos esenciales, formación de productos de degradación potencialmente tóxicos entre otros.

Durante la fabricación, almacenamiento y uso de las aceites, debe tenerse especial cuidado ya que puede detenerse esta reacción una vez iniciada o aletargarla tanto como sea posible.

La medida del grado de oxidación se efectúa determinando la cantidad de oxígeno absorbido o de los cambios en el índice de peróxidos con el tiempo de un peso de grasa dado. La medida del índice de peróxidos tiene un valor muy limitado en grasas de fritura ya que a altas temperaturas 176.6 °C, los peróxidos son volátiles (Lawson, 1999).

La autooxidación comienza en las zonas de insaturación de las grasas o aceites, ya que son las más susceptibles. Las reacciones que tienen lugar, se producen a través de radicales libres, a continuación se describe la secuencia:

I. Iniciación o inducción

Los cambios son relativamente pequeños y ocurren a una velocidad uniforme. Las moléculas de grasa forman radicales grasos libres en presencia de iniciadores como la luz ultra violeta, calor y metales pesados como el cobre, los compuestos

formados en esta fase no tienen sabor ni olor, las propiedades gustativas no cambian, pero son inestables dando lugar a la fase de propagación como se muestra la reacción en la figura 5.

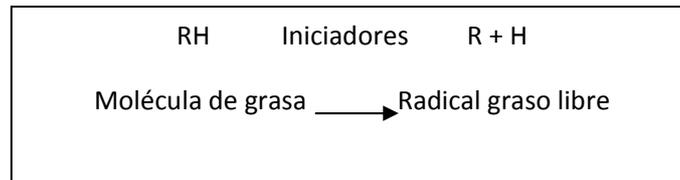


Figura 5. Reacción de Inducción

II. Propagación

Tiene lugar una serie de reacciones encadenadas, con diferente velocidad de reacción. Esta fase necesita de la presencia de oxígeno y de un cierto grado de humedad, la descomposición de los hidroperóxidos da lugar a la formación de una amplia variedad de aldehídos, cetonas e hidrocarburos, compuestos responsables de sabores y olores a rancio. La figura 6 muestra la reacción de propagación formando así hidroperóxidos.

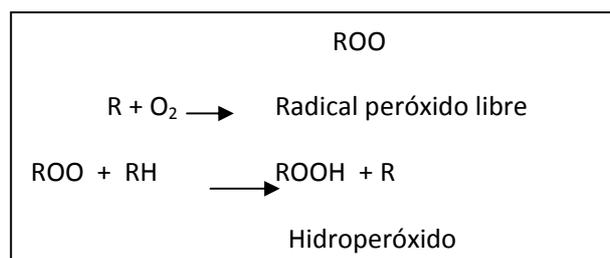


Figura 6. Reacción de Propagación (Lawson, 1999)

III. Finalización

Los diferentes radicales libres (R^{*}) reaccionan entre sí, formando dímeros (RR), hidroperóxidos (ROOH), y peróxidos (ROOR); la ruptura de estos últimos genera

compuestos estables como aldehídos y cetonas, responsables del olor rancio de las grasas.

4.2.3 Polimerización y/o rancidez por absorción

Se caracteriza por la producción de uniones cruzadas entre cadenas de ácidos grasos no saturados, directamente o a través de átomos de oxígeno, y que pueden dar lugar a estructuras cíclicas. Están favorecidas por tratamientos térmicos altos (Cubero, et. al. 2002). Proceso en el cual las grasas pueden absorber olores ajenos al producto.

4.2.4 Determinación de la estabilidad de una grasa en producto terminado

El proceso oxidativo de los aceites y grasas es una de las principales causas del deterioro de las principales características organolépticas y características nutritivas de los productos alimenticios, debido a esto se analiza el producto antes de su salida al mercado para evitar que el proceso de enranciamiento se vea acelerado por un mal manejo del producto.

4.2.4.1. Método del oxígeno activo (MOA)

Es una prueba predictiva y acelerada de la rancidez, es una medida de la estabilidad oxidativa, que está siendo sustituida por el índice de estabilidad del aceite (IEA), el cual se ha automatizado mediante el empleo de instrumentación de Omnion, Inc. (Oxidative Stability Instrument) o de Brinkmann Instrument (Rancimat).

4.2.4.2. Índice de peróxidos

Es una medida del estado de oxidación de un aceite o grasa. Los factores que influyen son los ácidos grasos que los forman, la duración y el tipo de almacenamiento (Lawson, 1999).

El índice de peróxido se expresa como miliequivalentes de oxígeno activo contenidos en un kilogramo de la materia ensayada, calculados a partir del yodo liberado del yoduro potásico. Las sustancias que oxidan el yoduro potásico se supone son peróxidos u otros productos similares de oxidación de la grasa (AMV, 1988).

La norma permite no más de 10 miliequivalentes de oxígeno peroxídico/kg de grasa o aceite (Codex, 1993).

4.2.4.3. Índice de acidez

Se calcula en miligramos de hidróxido potásico necesario para neutralizar un gramo de materia grasa, se expresa en tanto por ciento de ácido oléico (AMV, 1988).

4.2.4.4. Caracterización de ácidos grasos por cromatografía gaseosa

La cromatografía es un método físico de separación de mezclas moleculares en el cual los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales constituye la fase estacionaria, y la otra es un fluido (fase móvil) que pasa a través o a lo largo de la fase estacionaria (puede ser un sólido o un líquido dispuesto sobre un sólido que actúa como soporte, de gran área superficial). La fase móvil es un fluido (puede ser gas, líquido o fluido supercrítico) que se usa como portador de la mezcla.

4.3 ANTIOXIDANTES

De acuerdo a Finkel y Holbrook, (2000) un antioxidante es una sustancia capaz de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres mediante la liberación de electrones, los que son captados por los radicales libres. Así mismo son definidos por el código alimentario como aquellas sustancias que por separado o mezcladas entre sí, pueden utilizarse para impedir o retardar, en los alimentos y bebidas, las oxidaciones catalíticas y procesos que llevan a enranciamientos naturales provocados por la acción del aire, luz o indicios metálicos (Cubero, *et. al.* 2002).

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado o libre por lo que son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena (Avello, Suwalsky, 2006). El radical libre tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un gran daño.

También se pueden definir como los aditivos que se usan para conservar los alimentos, ejerciendo una acción estabilizadora retrasando el deterioro que puede llegar a rancidez o decoloración, debido a la oxidación. Los antioxidantes capturan el oxígeno, antes de que puedan llegar hasta los componentes de los alimentos.

Como su nombre lo indica impiden los procesos de oxidación, es decir, las alteraciones producidas por la acción del aire (Eldadfa, 1999). Reaccionan con los radicales libres producidos durante la oxidación, los estabilizan y se producen radicales del antioxidante que son estables debido a su resonancia, y por lo tanto no promueven la oxidación como lo hacen los radicales de los ácidos grasos.

También pueden hacer retroceder procesos de oxidación ya iniciados, añadidos se consumen a medida que desarrollan su actividad, y por lo tanto, dejan de ser efectivos con el tiempo, puede retrasarse el enranciamiento de las grasas durante un determinado tiempo, pero no detenerlo del todo. El uso simultáneo de diferentes antioxidantes ha demostrado ser eficaz, estos actúan incluso en concentraciones bajas (de un 0.05 hasta un 0.1%), distribuyéndose de forma homogénea, (Eldadfa, 1999).

Cubero *et. al.* (2002) menciona que la mayoría de los productos grasos tienen sus propios antioxidantes naturales, aunque muchas veces estos se pierden durante el procesado industrial y han de ser aportados nuevamente.

Los antioxidantes actúan de diferentes maneras: a) deteniendo la reacción en cadena de oxidación de las grasas, b) eliminando el oxígeno atrapado o disuelto en el producto, o en el espacio de cabeza de los envases, c) eliminando trazas de ciertos metales, d) inactivándose ellos mismos.

De acuerdo a Cubero, (2002); Badui, (1999) y Anónimo, (2008), los requisitos con los que deben cumplir los antioxidantes son: a) que su utilización sea segura, b) baja volatilidad para que no escapen del aceite durante la fritura, c) no impartan olor, sabor ni color a los alimentos, d) que sea efectivo en concentraciones muy bajas, e) se incorpore fácilmente en los alimentos, que sea soluble y tenga una buena dispersión, f) sea estable durante el procesamiento y en el producto final, g) que esté disponible a un bajo costo.

4.3.1 Clasificación

Se pueden encontrar clasificados los antioxidantes en naturales y artificiales observando ventajas y desventajas en la tabla 1.

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los antioxidantes naturales y sintéticos (Valenzuela y Nieto, 1996).

Antioxidantes Sintéticos	Antioxidantes Naturales
Más económicos	Algunos de ellos caros
Amplia aplicación	Uso restringido
Actividad antioxidante media-alta	En algunos casos, amplio rango de actividad antioxidante
Seguridad cuestionada	Percibidos como inocuos
Prohibición de la utilización de algunos de ellos	Incremento del uso y expansión de las aplicaciones
Baja solubilidad en agua	En algunos casos, amplio rango de solubilidad
Bajo interés en alimentación	Alto interés en alimentación

4.3.1.1 Antioxidantes sintéticos

Se aplican en distintos productos manufacturados como, fármacos, cosméticos y alimentos, la mayoría son derivados de estructuras fenólicas, son ampliamente utilizados en la industria de los alimentos, sin embargo existe preocupación respecto de su seguridad, lo cual ha dirigido el interés hacia los antioxidantes naturales ya que éstos se consideran más seguros (Valenzuela, 2003), siendo los más utilizados:

4.3.1.1.1 Esteres del ácido gálico

Tienen un potencial antioxidante alto, pero su uso es limitado ya que tienden a unirse al hierro y son sensibles al calor. Suelen aplicarse con sinérgicos como el ácido cítrico,

que actúa como quelatante del hierro. En la figura 7 se observa la estructura del galato. Según el Codex alimentarius 1993, la dosis permitida es, 100mg/kg.

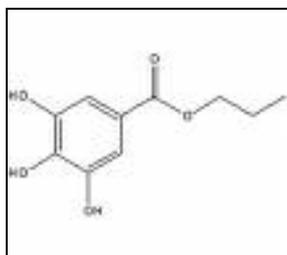


Figura 7. Estructura del Galato

4.3.1.1.2 E-320 Butil hidroxianisol (BHA)

El butil-hidroxianisol (figura 8) se presenta comercialmente como una mezcla de dos isómeros, 3-terbutil-hidroxianisol, 2-terbutil-hidroxianisol, predominando en su composición la primera forma de los isómeros, llegando a ocupar un 90% del total. El anillo aromático conjugado del BHA es capaz de estabilizar a un radical libre, secuestrándolo. Al actuar como un agente secuestrante, se evitan posteriores reacciones de radicales libres.

Es ligeramente volátil, insoluble en agua y soluble en propilenglicol, aceites vegetales y parafina, (Cubero, *et. al.* 2002). Es el más usado comercialmente debido a su alta eficacia, su resistencia a variaciones de pH y por su sinergismo con otros antioxidantes.

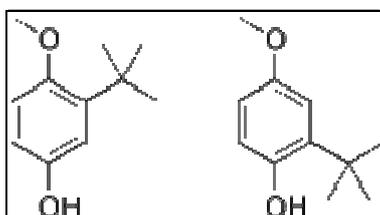


Figura 8. Estructura del Butil hidroxianisol

Se utiliza para proteger las grasas utilizadas en repostería, fabricación de bizcochos, sopas deshidratadas, etc. La dosis máxima permitida es 175 mg/kg, (Codex, 1993).

4.3.1.1.3 E-321 Butil hidroxitolueno (BHT)

Es otro antioxidante sintético procedente de la industria petrolífera empleado como aditivo alimentario. Polvo cristalino de color blanco, insoluble en el agua y propilenglicol pero soluble en etanol, aceites y parafinas. Se considera más efectivo en las aplicaciones a grasas animales que en aceites vegetales, tiene aplicaciones como protector del color y el aroma de los aceites esenciales, controla la oxidación de las grasas con componentes de ácidos grasos de cadena corta, en la figura 9 se observa la estructura del BHT. La dosis permitida es 75mg/kg, (Codex, 1993).

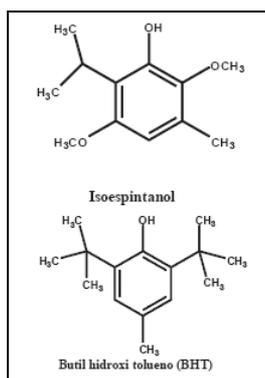


Figura 9. Estructura del Butil hidroxitolueno

4.3.1.1.4 Ter-Butilhidroxiquinona (TBHQ)

Se presenta como un sólido blanco y cristalino, (Cubero, 2002). Es el antioxidante sintético más potente y efectivo para la mayoría de las aceites vegetales, tales como el de cártamo, soya y algodón, en los últimos años ha adquirido mucha popularidad, ya que es más soluble en agua que el BHT, y el BHA, (Badui, 1999). Es importante considerar el efecto sinergista con las diferentes mezclas. Su uso no está autorizado en la Unión Europea, su estructura se observa en la figura 10.

Es considerado el mejor antioxidante para las aplicaciones de fritura, pero poco eficaz en los procesos de panificación u horneado, siendo su dosis máxima, 120 mg/kg, (Codex, 1993).

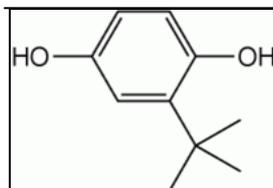


Figura 10. Estructura de la Ter-Butilhidroxiquinona

4.3.1.2 Antioxidantes naturales

El aumento de la preocupación de los consumidores por la seguridad alimentaria, ha despertado un gran interés en el uso de fuentes alternativas de compuestos con propiedades antioxidantes, que se consideran más seguras y deseables.

Antioxidantes naturales como tocoferoles, ácido ascórbico, el licopeno, flavonoides, y aceite esencial de romero, se encuentran en la actualidad disponibles para ser adicionados a los alimentos en reemplazo de los antioxidantes sintéticos, dentro de los antioxidantes naturales podemos encontrar:

4.3.1.2.1 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos poseen una estructura química especialmente adecuada para ejercer una acción antioxidante actuando como captore de radicales libres neutralizando peligrosas especies reactivas de oxígeno e iones metálicos quelatantes.

4.3.1.2.2 Flavonoides

Son derivados de la 2-fenilcromona o 2-fenilbenzopirona, se encuentran en las células fotosintéticas, semillas, frutas y flores. Son potentes quelatantes de metales. La posición y el nivel de sustitución de los grupos hidroxilo de su estructura son las claves de sus propiedades antioxidantes (Anónimo, 2008).

Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelatación del hierro y otros metales de

transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo. Sus propiedades anti-radicales libres se dirigen fundamentalmente hacia los radicales hidroxilo y superóxido, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica (Martínez *et. al.* 2002).

4.3.1.2.3 E-306/E-309 Tocoferoles

Son antioxidantes naturales, que se encuentran en cuatro formas isómeras: alfa, beta, gamma y delta, su acción antioxidante disminuye de la forma delta a la alfa. Se comercializan como concentrados de tocoferoles con un aspecto de aceite viscoso, de color rojizo, limpio e inodoro. Se puede obtener por extracción de aceites naturales, germen de trigo, arroz, maíz o soya, sin embargo resisten alrededor de un 60-70% al proceso de refinado, teniendo una mayor pérdida en el proceso de desodorización debido a las altas temperaturas.

Cubero *et.al.* (2002) mencionan que los tocoferoles son considerados los antioxidantes naturales de las grasas y aceites, siendo relativamente débiles. Su acción va ligada a un mecanismo de eliminación del oxígeno del medio por la formación de tocoquinonas, hecho que no tiene lugar con los antioxidantes del tipo fenólico.

Los usos más comunes son en conservas vegetales, quesos fundidos y grasas. Se utilizan en aceites de fritura aunque su estabilidad a la temperatura y oxidación es baja.

La dosis permitida en tocoferoles naturales y sintéticos es de 500 mg/kg, (Codex, 1993).

4.3.1.2.4 Ácido dihidrolipoico (DHHLA)

Recibe este nombre por su solubilidad en lípidos, es un fuerte reductor capaz de interaccionar con especies reactivas de oxígeno como los radicales hidroxilo, peroxilo y superóxido, el ácido hipocloroso, y el oxígeno singlete, es capaz de quelatar iones metálicos y de regenerar el ascorbato (Anónimo, 2008).

4.3.1.2.5 Aceites esenciales

Los aceites esenciales son sustancias odoríferas de naturaleza oleosa encontradas prácticamente en todos los vegetales, el uso de aceites esenciales de condimentos y

especias tanto en la industria de los alimentos como en la industria farmacéutica es cada vez más generalizado.

4.3.1.2.5.1 Extracto de romero

Contiene cuatro compuestos con propiedades antioxidantes: carnosol, rosmanol, isorosmanol y rosmaridifenol. Se comercializa como aceite que contiene estos compuestos concentrados y que no presenta ni olor ni sabor característico de esta planta. Se ha utilizado con éxito en diversos alimentos como salsas, mayonesas, carnes procesadas y pollo, (Anónimo, 2008)

En el 2000 Che-Man y Jaswir, reportaron que el extracto de romero tenía una fuerte capacidad antioxidante y una buena estabilidad térmica, (Romalho, Neuza, 2008), así mismo Morales (2005) y Rangel (2007) demostraron la gran capacidad como antimicrobiano del aceite esencial de orégano.

4.4 ORÉGANO (*Lippia berlandieri Schauer*)

4.4.1. Generalidades del orégano.

Por orégano, del griego “oro” y “ganos”, delicias de la montaña, se conoce a un amplio grupo de especies vegetales.

Maldonado, (1998) menciona que en México el orégano abarca 14 especies, 11 géneros y 14 familias, siendo uno de los países con mayor producción y exportación en el mundo, solo superado por Turquía (CONAFOR, 2000).

El orégano es un recurso forestal no maderable que se puede encontrar generalmente en regiones semiáridas y áridas del país, donde tradicionalmente se adquiere completamente seco, en hojas enteras, quebradas o bien molidas. Se trata de una planta fuertemente olorosa y de gran sabor, fácil de percibir cuando se añaden sus hojas en alimentos. El orégano comprende varias especies de plantas que son utilizadas con fines culinarios, siendo las más comunes el *Origanum vulgare*, nativo de Europa, y el *Lippia graveolens*, originario de México. Entre las especies de *Origanum* se encuentran como componentes principales el limoneno, el β -cariofileno, el r -cimeno, el canfor, el linalol, el a -pineno, el carvacrol y el timol. En el género *Lippia* pueden encontrarse estos

mismos compuestos. Su contenido depende de la especie, el clima, la altitud, la época de recolección y el estado de crecimiento, (Arcila *et. al.* 2003).

4.4.2 Características botánicas

Las plantas de orégano mexicano se encuentran en suelos generalmente pedregosos de cerros, laderas y cañadas.

La mayor producción para fines comerciales es el género *Lippia*, cuya especie más abundante en México es *Lippia berlandieri* Schauer, la cual se concentra en los estados de Coahuila, Durango, Guanajuato, Jalisco, Querétaro, San Luis Potosí y Zacatecas. En la figura 11 se observan las hojas de la planta del orégano especie *Lippia berlandieri*.



Figura 11. *Lippia berlandieri*

Son arbustos que alcanzan hasta 2.5 m de alto y desarrollan en promedio 1.20 m de follaje. La planta tiene tallos ramificados con una gran cantidad de hojas, de 1 a 3 cm de largo y 0.5 a 1.5 cm de ancho, son opuestas, alternas y de forma ovalada con bordes dentados, que constituyen la parte aprovechable.

4.4.3 Clasificación taxonómica

De acuerdo a las características morfológicas, al orégano establecido en el sur de Chihuahua le corresponde la siguiente clasificación, la cual se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Taxonomía del orégano (Silva, 2003)

Reino	Vegetal
Categoría	<i>Metaphyta</i>
División	Tracheopyta
Subdivisión	<i>Pteropsida</i>
Superclase	<i>Speropsida</i>
Clase	<i>Angiosperma</i>
Subclase	<i>Dicotiledoneae</i>
Serie	<i>Gamopetalas</i>
Orden	<i>Lamiales</i>
Familia	<i>Verbenaceae</i>
Género	<i>Lippia</i>
Especie	<i>Berlandieri</i>

4.4.4 Clima y suelo

El clima donde prospera es muy variado, teniendo así los mayores rendimientos en aceite esencial, en zonas soleadas cuya altitud se encuentre entre 1400 a 1600ms/nm, en suelos pedregosos con un pH de 7.3 a 7.6; con clima seco semicálido (Silva, 2003).

4.4.5 Composición química

Existen diversos estudios sobre la composición química del orégano, usando extractos acuosos y sus aceites esenciales. Se han identificado flavonoides como la apigenina y la luteolina, agliconas, alcoholes alifáticos, compuestos terpénicos y derivados del fenilpropano (Catonga, 2006). En la figura 12 se observan algunos de los compuestos que podemos encontrar en el aceite esencial de orégano.

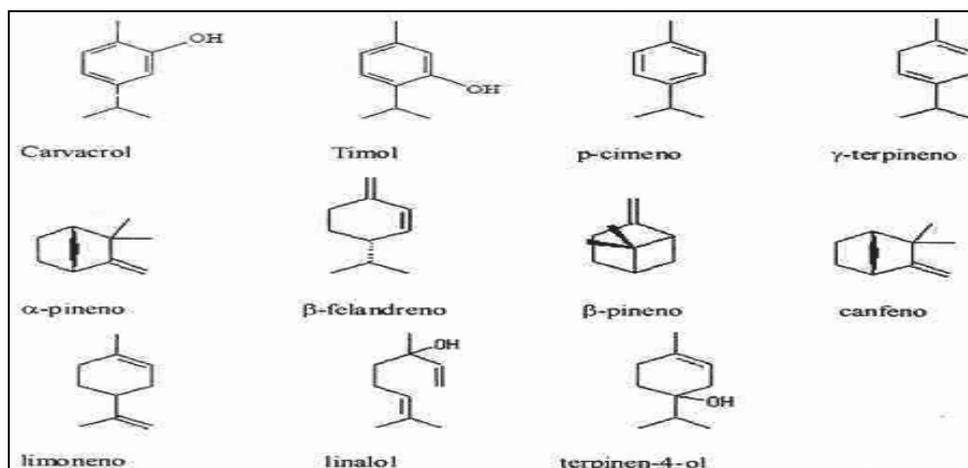


Figura 12. Estructura química de los principales componentes del orégano.

4.4.6 Definición de aceite esencial

Desde la antigüedad, la humanidad ha aislado compuestos orgánicos a partir de las plantas. Cuando se calientan ligeramente es posible obtener mezclas de compuestos olorosos que se conocen como aceites esenciales o esencias vegetales, que se encuentran en diversas partes de la planta.

Los aceites esenciales son metabolitos secundarios, son mezclas de varias sustancias químicas biosintetizadas por las plantas que dan aroma característico a algunas flores, árboles, semillas y a ciertos extractos de origen animal, son intensamente aromáticos.

En un aceite esencial pueden encontrarse hidrocarburos alicíclicos y aromáticos, así como sus derivados oxigenados (alcoholes, aldehídos, cetonas y ésteres), sustancias azufradas y nitrogenadas. Algunos autores señalan que la variabilidad en la composición química de los aceites esenciales es debida al origen del material, otros se lo otorgan al medio ambiente, estación de corte y a la cantidad de agua usada en el riego.

4.4.6.1 Método de extracción

Los métodos empleados hoy en día para la extracción de aceites esenciales son la destilación con arrastre de vapor y el uso de solventes orgánicos. En los últimos años ha crecido el interés por la extracción supercrítica y subcrítica con dióxido de carbono como solvente, este gas es ideal, no es tóxico ni explosivo. Los rendimientos de extracción

varían del 1.8% hasta el 5.6%. En la figura 13, se observa el sistema por arrastre de vapor.

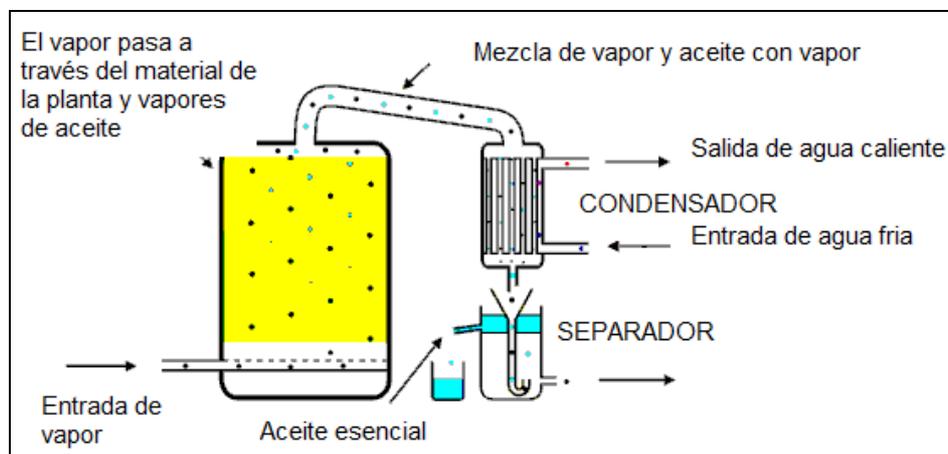


Figura 13. Sistema de arrastre por vapor

4.4.6.2 Principales elementos químicos del aceite esencial de orégano

Se han logrado identificar hasta 56 compuestos, y se han encontrado diferencias cuantitativamente significativas en sólo dos fenoles isoméricos, carvacrol (0.1-56.6%) o fenol no-cristalizable y timol (7.9-53.6%) o fenol cristalizable; incluyéndose sus precursores biosintéticos el t-terpineno y el p-cimeno.

Los principales componentes del orégano por sus diferentes usos a nivel mundial son el timol y el carvacrol (Juárez, 2006). En la figura 14 se presenta la estructura del Timol y el Carvacrol.

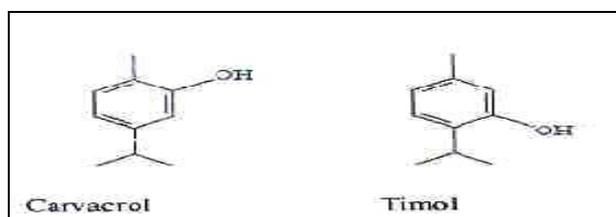


Figura 14. Principales componentes del aceite de orégano.

La determinación de la calidad en el aceite de orégano se ha establecido en función de la concentración de carvacrol (Juárez, 2006), la cual se obtiene mediante cromatografía de gases.

Los aceites cuentan con antioxidantes sintéticos, sin embargo hoy en día las tendencias están conduciendo a la utilización de productos naturales que no produzcan un efecto nocivo a la salud, los aceites esenciales de diferentes plantas que se utilizaban como condimento principalmente, se le han descubierto propiedades conservadoras entre otras, lo cual permite tener alimentos, medicamentos entre otros productos con aditivos naturales.

El aceite esencial de orégano el cual tiene compuestos principalmente como el timol y el carvacrol, se ha estudiado su efecto antimicrobiano, no siendo así probado su capacidad antioxidante, y la cual es el propósito del presente estudio, conocer si existe una capacidad antioxidante por parte del aceite de orégano en aceites comestibles.

CAPÍTULO V

MATERIALES Y METODOS

5.1 LOCALIZACIÓN DEL SITIO EXPERIMENTAL

El presente trabajo se realizó en dos localidades, la primera en los laboratorios de Nutrición Animal, y Ciencia y Tecnología de Alimentos de la “Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro”, ubicada en Buenavista, Saltillo Coahuila México, donde se llevaron a cabo las pruebas de rancidez hidrolítica y oxidativa.

La segunda localidad fue en el departamento de FAPC (Food and Agricultural Products Center), a cargo de la Ph.D Bioprocessing/ Oilseed Processing Associate Profesor, Biosystems and Agricultural Engineering, Nurhan T. Dunford en la Universidad del Estado de Oklahoma (OSU) Estados Unidos de Norteamérica, donde se realizó la caracterización del aceite esencial de orégano, la estabilidad oxidativa por el método rancimat, así como la capacidad secuestrante del radical estable DPPH y la capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno (ORAC).

5.2 MATERIAL Y EQUIPO DE LABORATORIO

5.2.1 Material

- Aceite esencial de orégano: fracciones Timol-Carvacrol, Timol y Carvacrol, proporcionados por el CIRENA (Centro de Investigación para los Recursos Naturales), situado en Salaices, Villa López, Chihuahua, México.
- Aceite de canola
- Aceite de pescado
- Antioxidante Butil hidroxi-tolueno (BHT)

5.2.2 Equipo

- Rancimat 743

- Espectrofotómetro Du 520
- Aparato Perkin Elmer HTS 7000 Plus Bio Assay Reader
- Cromatógrafo de gases marca Perkin Elmer

5.3 METODOLOGÍA

5.3.1 ETAPA I. COMPONENTES DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO

5.3.1.1 Caracterización del aceite esencial de orégano

El aceite esencial de orégano fue caracterizado utilizando un cromatógrafo de gases marca Perkin Elmer, el cual se basa en la diferente distribución de la fase móvil utilizando como acarreador al helio sobre la fase estacionaria.

5.3.1.2 Polifenoles totales

La concentración de fenoles totales en las diferentes fracciones del aceite esencial de orégano fue medida por espectrofotometría, basándose en una reacción colorimétrica de oxido-reducción. El agente oxidante fue el reactivo de Folin-Ciocalteu, según el método descrito por Singleton y Rossi 1965. El porcentaje de fenoles totales se calculó a partir de la curva de calibración del ácido gálico.

5.3.1.3 Estabilidad oxidativa (método Rancimat)

Se promovió el deterioro oxidativo del aceite mediante el empleo del equipo Rancimat 743, a una temperatura constante de 120⁰C con un flujo de aire a una velocidad de 20 litros/hora.

Para este estudio se emplearon muestras de aceite de pescado adicionadas con las fracciones Timol-Carvacrol, Timol y Carvacrol del aceite esencial de orégano a concentraciones 0, 0.01, 0.2, 0.4, 0.6 %.

5.3.2 ETAPA II. RANCIDEZ HIDROLÍTICA Y OXIDATIVA

5.3.2.1 Rancidez oxidativa

Se determinó el índice de peróxidos según el método oficial de la AOCS, 15th edición cd-8-53 y el índice de acidez, según el método oficial de la AOCS, 15th edición Ca 5^a40.

Para éste análisis se utilizó aceite de canola con y sin su antioxidante comercial, las muestras fueron expuestas a rayos de luz ultravioleta durante dos minutos cada 20 minutos por un lapso de 24 horas, obteniendo muestras por duplicado cada 2 horas.

5.3.2.2 Rancidez hidrolítica.

Se llevó a cabo la determinación del índice de acidez, según el método oficial de la AOCS, 15th edición Ca 5^a40.

El aceite de canola marca capullo fue estudiado con su antioxidante comercial TBHQ 0.004 %, así como sin este antioxidante, el cual fue extraído siguiendo la metodología del anexo A.

El aceite de canola con y sin antioxidante fueron adicionados con las fracciones Timol-Carvacrol, Timol y Carvacrol a concentraciones 0, 0.01, 0.02, 0.05 y 0.1%, para posteriormente ser expuestos a una temperatura de 100^oC durante 56 horas, obteniendo muestras por duplicado para el análisis cada 8 horas.

Para la valoración se utilizó un modelo multifactorial 5x3x2.

5.3.3 ETAPA III. DETERMINACIÓN DE ANTIOXIDANTES

5.3.3.1 Capacidad secuestrante del radical estable DPPH

El compuesto 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) es un radical estable que presenta una intensa coloración violeta y que absorbe radiación a 517 nm, de forma que su concentración se puede determinar mediante métodos espectrofotométricos (Betancort, 2006), el análisis se realizó durante 60 minutos tomando lectura cada 30 segundos. En el estudio se determina la concentración inicial de DPPH y la concentración resultante una vez que se ha añadido el posible antioxidante, de forma que una disminución de la absorción de radiación se traduce en una disminución de la concentración de DPPH

debida a la donación de electrones de la especie antioxidante, lo que da como resultado un cambio de color púrpura a amarillo.

Las muestras utilizadas fueron las fracciones Timol-Carvacrol, Timol, Carvacrol, y para poder hacer un comparativo con un antioxidante comercial, se utilizó el Butil hidroxitolueno (BHT), siguiendo la técnica OSU, FAPC: Food and Agricultural Products Center, 2008, como se muestra en el anexo B.

5.3.3.2 Capacidad de Absorción del Radical Oxígeno (ORAC)

Este análisis se realizó con el Aparato Perkin Elmer HTS 7000 Plus Bio Assay Reader, siguiendo la técnica: OSU, FAPC 314, Fruit & Vegetable Products Lab, 2008, (anexo C), la cual se basa en el daño de los radicales libres sobre la fluoresceína que provoca una degradación en la intensidad del color. El 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico (Trolox), actúa como control, mientras que el (2,2 Azobis 2-amidinopropano) AAPH, genera los radicales libres que atacan a la fluoresceína.

Las muestras utilizadas fueron las fracciones Timol-Carvacrol, Timol, y Carvacrol del aceite esencial de orégano, la prueba se realizó por triplicado.

CAPÍTULO VI

RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1. ETAPA I. COMPONENTES DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO

6.1.1 Caracterización del aceite esencial de orégano

La caracterización del aceite esencial de orégano se llevó a cabo mediante cromatografía de gases como se muestra en la figura 15.

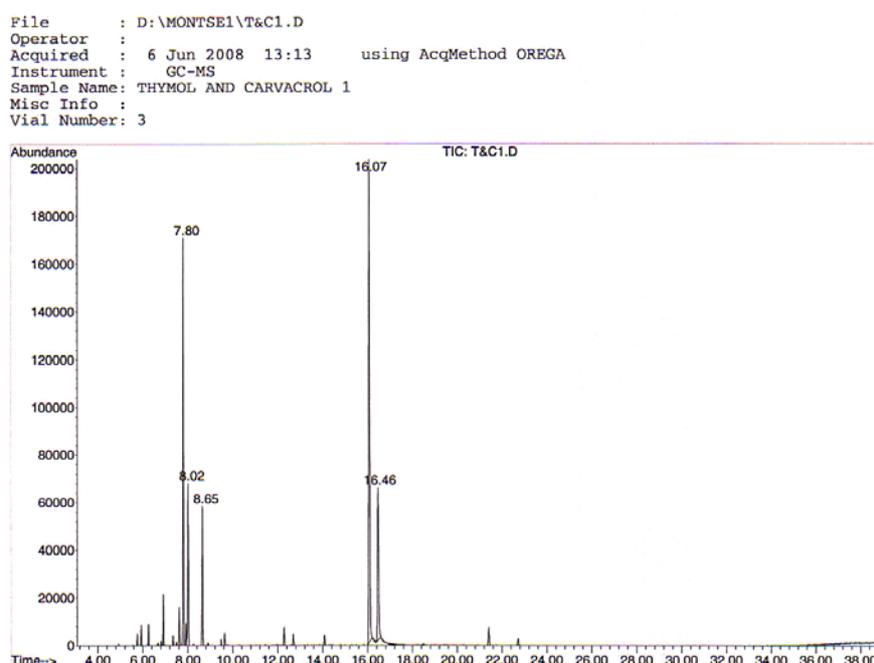


Figura 15. Cromatograma del aceite esencial de orégano.

El aceite esencial de orégano cuenta con diferentes compuestos, los picos que se presentan en la figura 15, son la representación de cada uno de los compuestos del aceite esencial.

Morales (2005) y Rangel (2007), mencionan que los compuestos que se encuentran en mayor proporción en el aceite esencial de orégano son el Timol y Carvacrol como se puede apreciar en la figura 15, teniendo para el Timol un tiempo de absorción de 7.80

minutos y para Carvacrol 16.07 minutos. En la tabla 3, se observan los porcentajes de los compuestos del aceite esencial de orégano.

Tabla 3. Porcentaje de componentes en el aceite esencial de orégano.

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	7.800	815	826	840	BB	170240	3566247	54.79%	23.575%
2	8.018	852	864	873	VB 3	67880	1529250	23.50%	10.109%
3	8.652	965	975	986	BB 2	58000	1312277	20.16%	8.675%
4	16.076	2259	2274	2296	BB	201242	6508738	100.00%	43.026%
5	16.465	2325	2342	2363	BB 3	64028	2210872	33.97%	14.615%

En la tabla 3 el número 1 corresponde a la fracción Timol y el 4 al Carvacrol, teniendo así este último un alto porcentaje dentro del aceite esencial, por otro lado en la tabla 4 se presenta el nombre de los compuestos detectados en menores cantidades mediante cromatografía de gases.

Tabla 4. Compuestos en el aceite esencial de orégano detectados mediante cromatografía de gases.

Carvacrol	Isopropil-o-cresol
p-Cymen-2-ol	Fenol, 5-isopropil-2-metil
Antioxine	1-Hidroxi-2-metil-5-isopropilbenzeno
Isotimol	2-p-Cimenol
Karvakrol	5-Isopropil-o-cresol
2-Hidroxi-p-cimeno	3-Isopropil-6-metil-
2-Metil-5-isopropilfenol	Fenol, 3-isopropil-6-metil
5-Isopropil-2-metilfenol	Cimenol
2-Metil-5-(1-metileno)fenol	Hidroxy-p-cymene
o-Cresol, 5-isopropil	Metil-5-1(1-metileno)fenol
o-Timol	Oxicimol
p-Cymene, 2-hidroxi-	

6.1.2 Polifenoles totales

La concentración de fenoles totales en el aceite esencial de orégano se presenta en la tabla 5.

Tabla 5. Contenido de compuestos fenólicos en las fracciones del aceite esencial de orégano y antioxidante comercial BHA

Compuesto	mg Ácido gálico/ g extracto
Carvacrol	313.810
Timol-Carvacrol	266.401
Timol	243.308
BHA	211.819

En la tabla 5 se observa la presencia de fenoles en las diferentes fracciones del aceite esencial de orégano, mostrando así que la fracción Carvacrol contiene mayor cantidad de estos compuestos que las otras dos fracciones, cabe señalar que las tres fracciones del aceite esencial de orégano presentan una mayor cantidad de fenoles que el antioxidante comercial Butil-hidroxianisol, el cual es utilizado comercialmente como antioxidante en aceites. Por lo tanto es posible esperar que la muestra alta en carvacrol posea una mayor capacidad antioxidante ya que Cubero *et.al.* (2002) menciona que los fenoles son conocidos por su capacidad antioxidante.

6.1.3 Estabilidad oxidativa método Rancimat

Los datos obtenidos en la estabilidad oxidativa del aceite de pescado puro y adicionado con las diferentes fracciones del aceite esencial de orégano se presentan en la tabla 6.

Tabla 6. Tiempo de inducción del aceite de pescado adicionado con las fracciones del aceite esencial de orégano.

Compuesto	Concentración %	Tiempo de inducción (hr)
Aceite de Pescado	100	0.41
Timol-Carvacrol	0.01	0.40
Timol-Carvacrol	0.2	0.57
Timol-Carvacrol	0.4	0.73
Timol-Carvacrol	0.6	0.86
Timol	0.01	0.45
Timol	0.2	0.69
Timol	0.4	0.92
Timol	0.6	1.12
Carvacrol	0.01	0.45
Carvacrol	0.2	0.69
Carvacrol	0.4	0.90
Carvacrol	0.6	1.10
Carvacrol al 98%	0.6	0.56
Carvacrol	1	0.61
Carvacrol	2	0.64

Es posible observar en la tabla 6 el tiempo de inducción de cada una de las muestras analizadas, siendo así el tiempo del aceite de pescado puro de 0.41 horas, el cual se toma como base ya que es a este aceite al cual se le adicionaron las diferentes fracciones del aceite de orégano con diferentes concentraciones. Los resultados muestran que las diferentes fracciones del aceite de orégano trabajan como antioxidante ya que logran retardar el tiempo de oxidación del aceite de pescado, incrementando el tiempo de inducción conforme aumenta la concentración de las diferentes fracciones del aceite de orégano, en las figuras 16 y 17 se presentan gráficamente los diferentes tiempos de inducción.

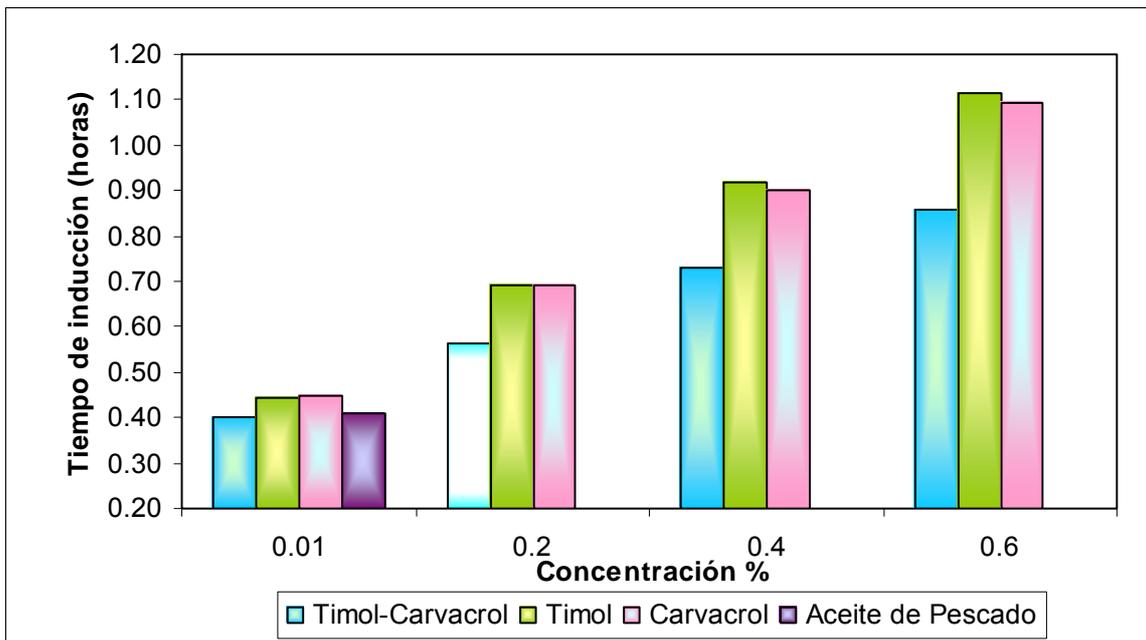


Figura 16. Estabilidad oxidativa.

En la figura 16 se observa que a medida que incrementa la concentración de las fracciones del aceite de orégano es mayor el tiempo de inducción del aceite de pescado, a una concentración del 0.01% con las diferentes fracciones del aceite de orégano el tiempo de inducción se encuentra entre las 0.40 y 0.50 horas, y a una concentración del 0.6% aumenta su tiempo a más de 0.90 horas, mostrando que a mayor concentración del aceite esencial en cualquiera de sus fracciones, es mayor el tiempo de inducción. Cabe mencionar que para este estudio, el aceite esencial de orégano trabaja mejor en sus fracciones Timol y Carvacrol que en su conjunto Timol-Carvacrol, concordando con Rangel (2007) en su estudio de aceite esencial de orégano aplicado como antimicrobiano, la cual menciona que el aceite tiene mejor efecto fraccionado que en su conjunto como se puede observar en el anexo III tabla B.

En función a los resultados que muestran que en Timol presenta el mayor tiempo de inducción para todos los tratamientos, se trabajó con el Carvacrol a diferentes concentraciones así como Carvacrol comercial al 98%, debido a que es más utilizado comercialmente, los datos generados se presentan en la figura 17.

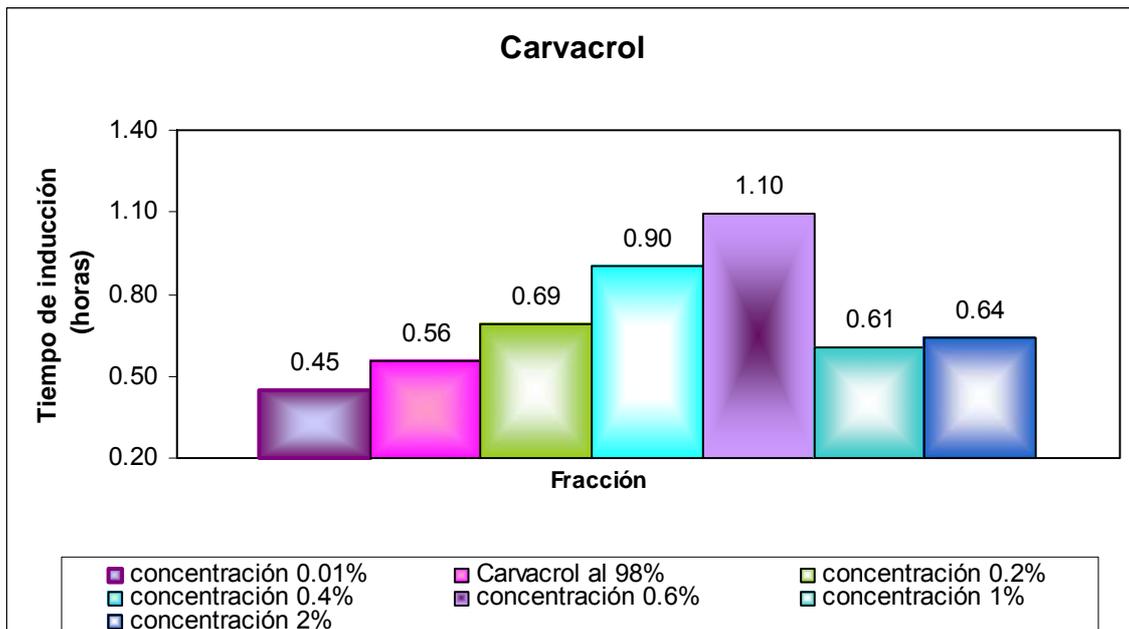


Figura 17. Estabilidad oxidativa del Carvacrol.

A fin de determinar la concentración que permitiera prolongar al máximo el tiempo de inducción se exploraron concentraciones del 0.01, 0.2, 0.4, 0.6, 1 y 2 % de la fracción Carvacrol en el aceite de pescado. Los datos obtenidos (figura 17) muestran que a medida que aumenta la concentración del Carvacrol, va aumentando el tiempo de inducción como se observa a una concentración del 0.6% en la cual se obtiene un tiempo de 1.10 horas, y a partir de ésta no se presenta un incremento en el tiempo de inducción si no por el contrario disminuye como se presenta en la concentración al 1% con un tiempo de 0.61 horas, esto se debe a que el aceite esencial en un principio está actuando como antioxidante, y a mayores concentraciones trabaja como pro-oxidante, así acelerando el proceso de rancidez como lo menciona Badui (1999).

Posteriormente en este análisis se utilizó Carvacrol al 98% obtenido comercialmente, al igual que en muestras anteriores se le adicionó al aceite de pescado a una concentración del 0.6%, los resultados mostraron (figura 17) que la fracción Carvacrol obtenida del aceite esencial de orégano, tiene mayor efecto que el Carvacrol al 98% obtenido comercialmente, el aceite de pescado adicionado con la fracción Carvacrol al 0.6% presentó un tiempo de inducción de 1.10 horas mientras que adicionada con el

Carvacrol al 98% presentó un tiempo de 0.56 horas, teniendo así un mejor efecto el Carvacrol obtenido del aceite esencial de orégano.

6.2 ETAPA II RANCIDEZ HIDROLÍTICA Y OXIDATIVA

6.2.1 Rancidez oxidativa

En la figura 18 se muestra el índice de peróxido del aceite de canola sin y con su antioxidante.

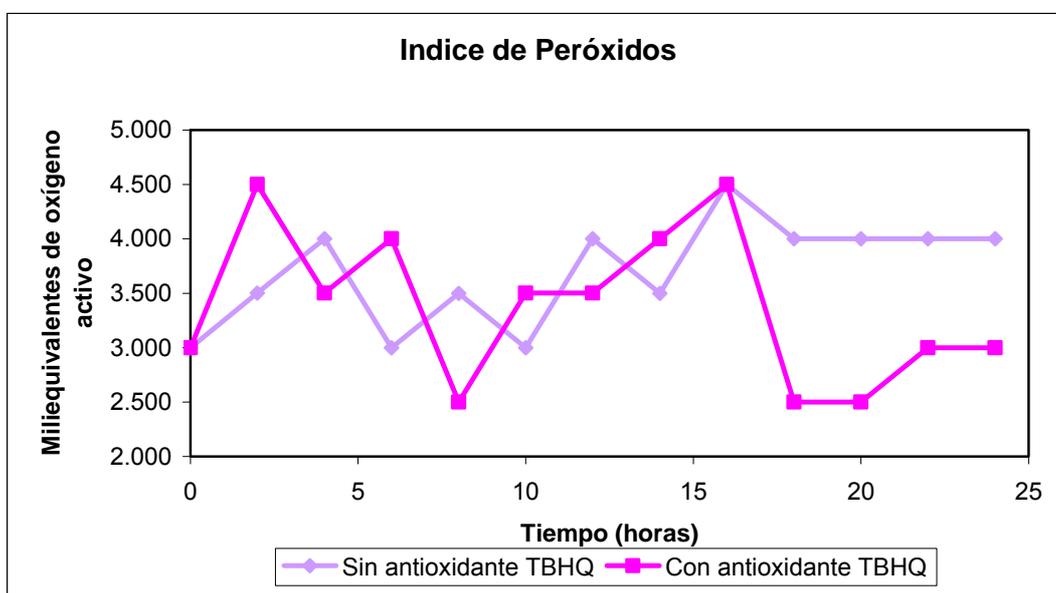


Figura 18. Índice de Peróxidos de aceite de canola con y sin antioxidante.

Como se muestra en la figura 18, la cantidad de peróxidos contenidos en la muestra de aceite de canola sin el antioxidante comercial es mayor que el aceite el cual si lo contiene, debido a que el TBHQ actúa como antioxidante, logrando así retardar la rancidez del aceite.

6.2.2 Rancidez hidrolítica.

En la figura 19 se muestra el índice de acidez del aceite de canola sin y con su antioxidante comercial.

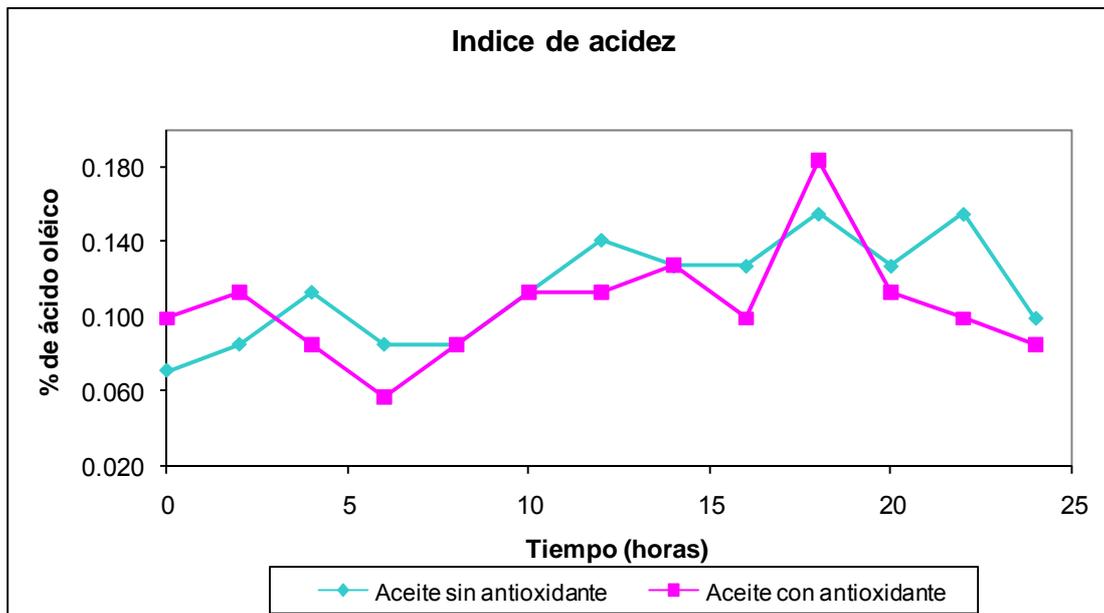


Figura 19. Índice de Acidez del aceite de canola con antioxidante y sin antioxidante.

Lawson (1999) menciona que a mayor índice de acidez, se tiene más cantidad de ácidos grasos libres, los cuales deterioran al producto, en la figura 19 se observa que el índice de acidez del aceite de canola con y sin antioxidante son diferentes, siendo la del aceite de canola sin antioxidante más alta ya que se acelera el proceso de deterioro debido a la cantidad de radicales libres, mientras que el aceite de canola con antioxidante actúa disminuyendo los radicales libres como lo menciona Badui (1999).

En la figura 20 se muestra el índice de acidez del aceite de canola adicionado con la fracción Timol-Carvacrol a diferentes concentraciones

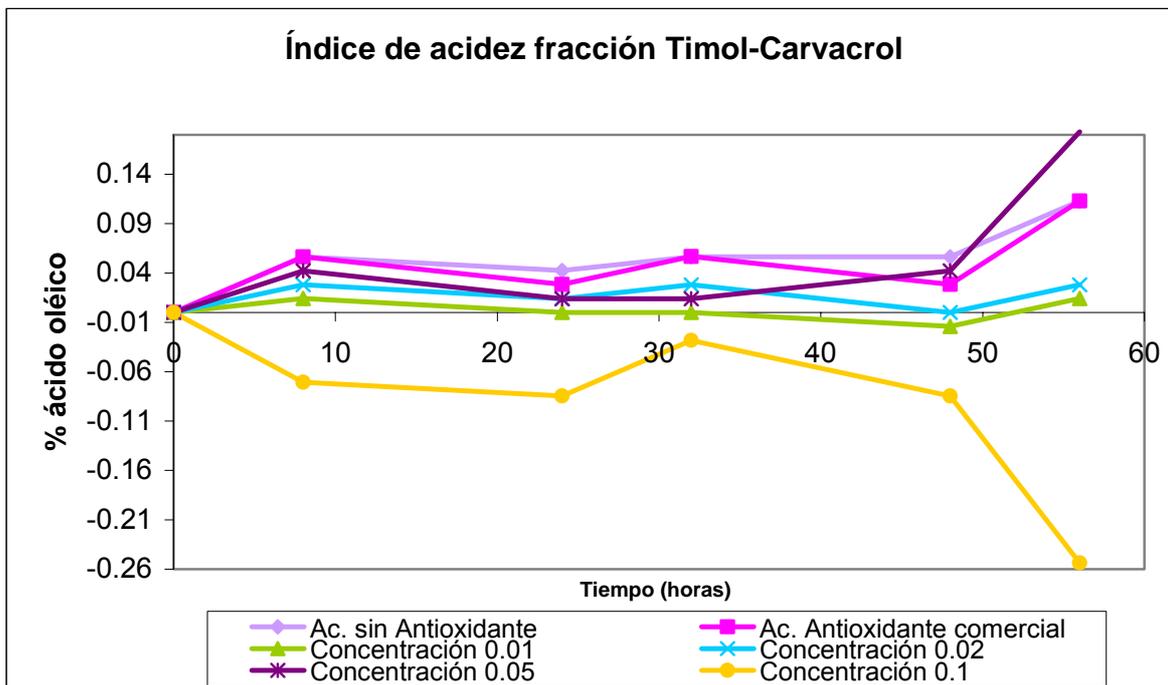


Figura 20. Índice de acidez fracción Timol-Carvacrol

Se determinó que en el aceite de canola adicionado con la fracción Timol-Carvacrol las concentraciones que demostraron tener una mejor capacidad antioxidante fueron 0.01 y 0.02%, debido a que lograron disminuir el índice de acidez con respecto al aceite de canola sin antioxidante la cual como se observa en la figura es mayor, el estudio también mostró que a mayores concentraciones no se tiene un efecto antioxidante, a una concentración del 0.1% el índice de acidez cuenta con un porcentaje de ácido oléico debajo de 0, lo cual se puede deber a que se están formando otros compuestos como lo menciona Lawson (1999), se sugiere hacer un estudio para conocer que compuestos son los que se forman en este proceso.

En la figura 21 se observa el índice de acidez del aceite de canola adicionado con la fracción carvacrol a diferentes concentraciones.

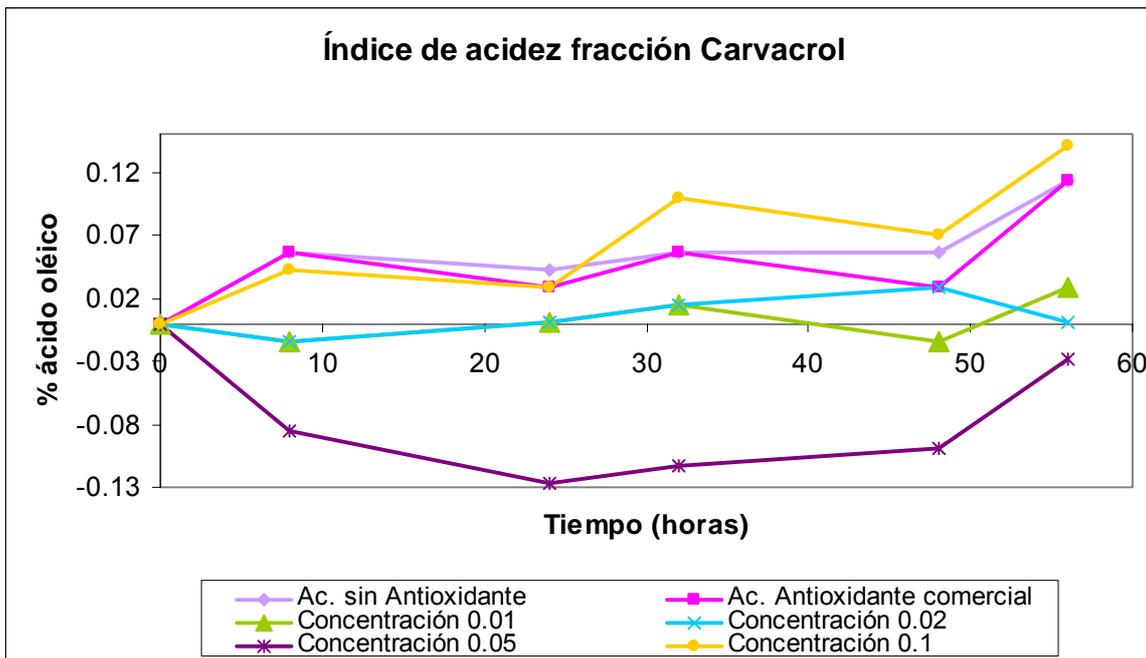


Figura 21. Índice de acidez de la fracción Carvacrol

En la figura 21 se observa que el aceite de canola adicionada con la fracción Carvacrol, a una concentración de 0.1% tiene un alto índice de acidez comparándolo con el que presenta el aceite de canola con y sin antioxidante, mientras que a una concentración del 0.05% los ácidos grasos libres son menores a 0 y no tiene un comportamiento constante, para este estudio las concentraciones 0.01 y 0.02% lograron mantener constante el índice de acidez, ejerciendo un poder antioxidante, y siendo óptimas concentraciones cualquiera de estas dos ya que no existe diferencia estadísticamente significativa.

En la figura 22 se observa el índice de acidez del aceite de canola adicionado con la fracción Timol a diferentes concentraciones en el aceite de canola.

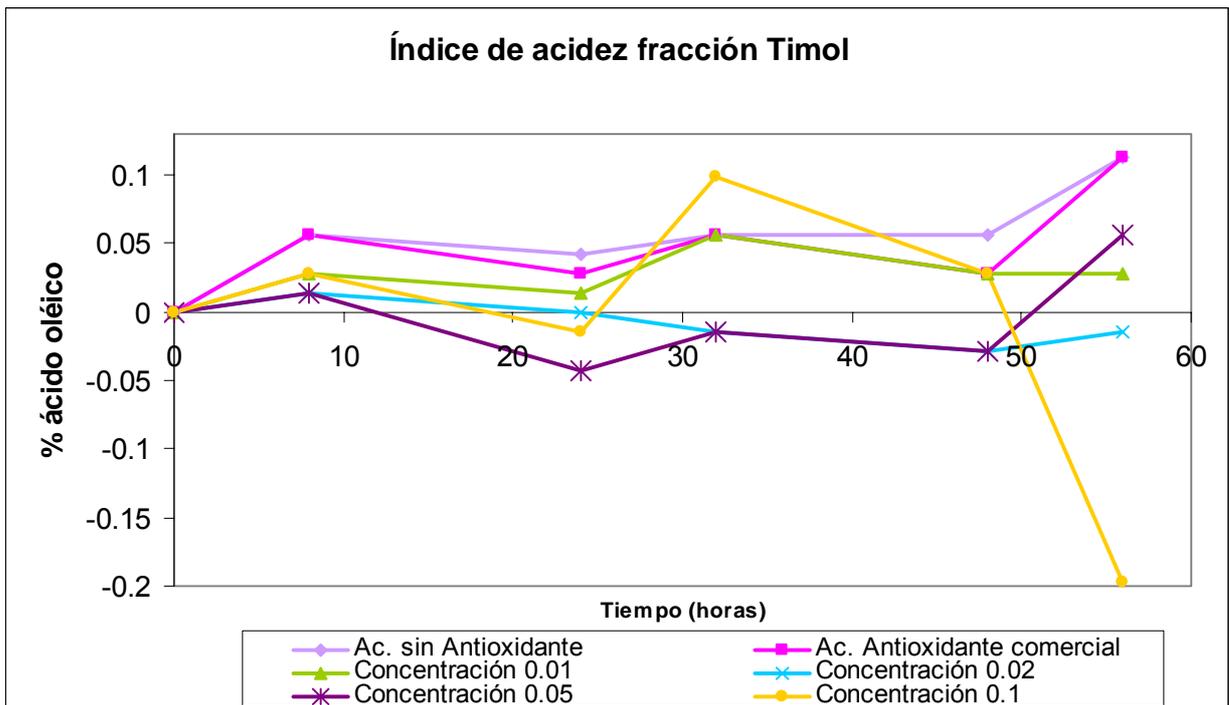


Figura 22. Índice de acidez fracción Timol.

Las diferentes concentraciones 0.01, 0.02, 0.05, 0.1% de la fracción Timol, como se muestra en la figura 22 presentan poder antioxidante ya que el índice de acidez es menor al aceite de canola con y sin antioxidante, sin embargo como se observa en la figura, la concentración al 0.1%, presenta un bajo índice de acidez, teniendo un comportamiento irregular presentando picos dentro del estudio, puede deberse a que a una alta concentración está actuando como pro oxidante y entonces su efecto se vuelve dañino como lo menciona Badui (1999), la concentración al 0.01 y 0.02%, son las que actúan mejor como antioxidantes ya que mantienen el índice de acidez más constante durante todo el estudio.

Posterior al estudio se analizaron las concentraciones y fracciones que tuvieron mejor efecto aplicado al aceite de canola (figura 23), para conocer cuál es la mejor fracción del aceite de orégano y a que concentración se proporciona un mejor efecto antioxidante.

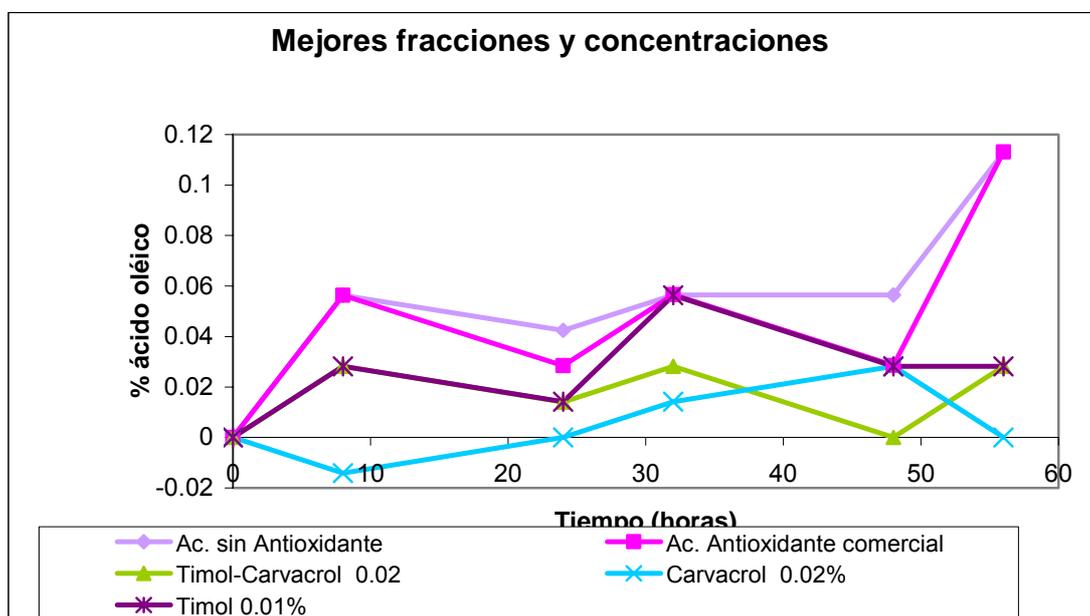


Figura 23. Índice de acidez fracción Timol-Carvacrol, Timol y Carvacrol

En la figura 23 se observa que se tiene un mejor efecto antioxidante a una concentración baja de 0.01 y 0.02% para cualquiera de las fracciones del aceite de orégano, teniendo la fracción Timol-Carvacrol un efecto constante, y mejor comportamiento que las fracción Carvacrol y Timol, no habiendo diferencia estadísticamente significativa, concordando con Chaquilla *et. al.* (2007), la cual menciona que al aceite esencial de orégano se le atribuye una capacidad antioxidante.

6.3 ETAPA III. DETERMINACIÓN DE ANTIOXIDANTES

6.3.1 Capacidad secuestrante del radical estable DPPH

En esta etapa se evaluó la capacidad que tienen las fracciones del aceite esencial de orégano para neutralizar un radical, así como el antioxidante BHT el cual fue utilizado como control.

En la figura 24 se observa la absorción de las diferentes concentraciones así como del testigo (BHT).

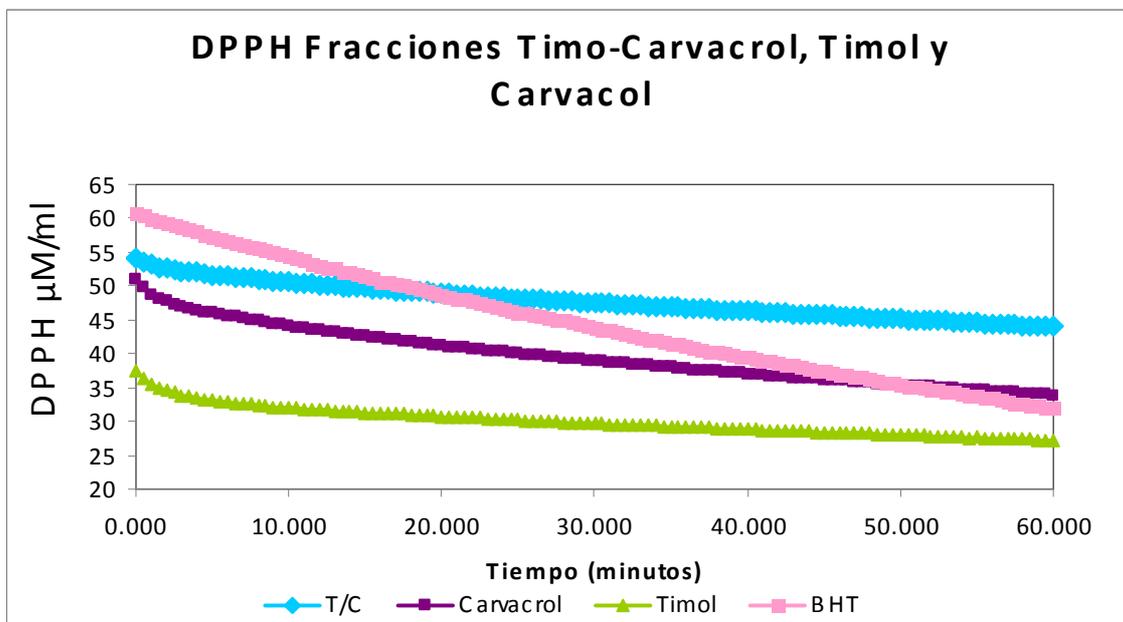


Figura 24. Gráfica de absorción del DPPH por las fracciones Timol-Carvacrol, Timol, Carvacrol, así como del control BHT

La actividad antirradical del DPPH se midió mediante el descenso provocado por la muestra en la absorbancia.

En el estudio realizado, las diferentes fracciones del aceite esencial de orégano lograron reducir el radical DPPH (figura 24), observando así que la fracción Timol tuvo un mejor efecto antirradical en el tratamiento, se utilizó como control el BHT el cual es un antioxidante comercial, presentando una actividad antirradical, pero cabe mencionar que al inicio del tratamiento hubo mayor actividad por parte de las fracciones del aceite esencial que del antioxidante comercial.

A partir de este estudio se calculó el porcentaje de inhibición de cada una de las fracciones así como del testigo (BHT), como se observa en la figura 25.

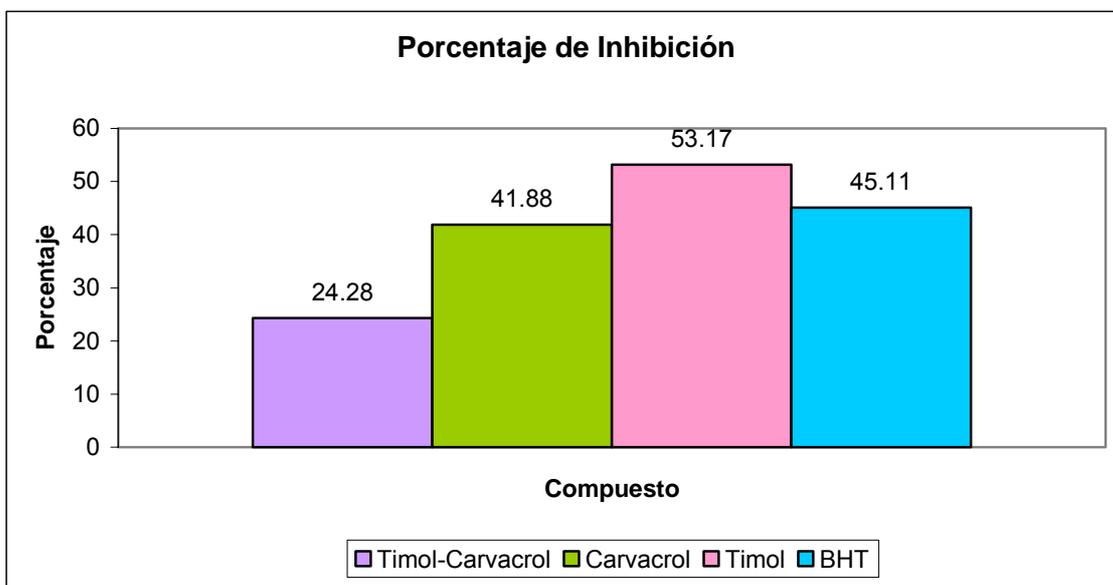


Figura 25. Porcentaje de inhibición antioxidante

Las tres fracciones del aceite esencial de orégano tienen capacidad inhibitoria del radical estable DPPH, el estudio mostró que la fracción Timol tiene mayor capacidad antioxidante, aún mayor que el antioxidante comercial BHT, y también señala que el aceite esencial de orégano tiene un mayor efecto en sus fracciones Timol y Carvacrol que en su conjunto Timol-Carvacrol.

6.3.2 Capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno (ORAC)

En esta prueba se cuenta con los compuestos AAPH el cual es el encargado de generar radicales libres, Trolox que es utilizado como testigo, los posibles antioxidantes: fracciones Timol-Carvacrol, Timol y Carvacrol y la Fluoresceína con la cual se mide la capacidad antioxidante en base al cambio de color, ya que la degradación indica el daño causado por los radicales libres debido a la interacción radicales Peroxilo-Fluoresceína, en la figura 26 se muestran los resultados.

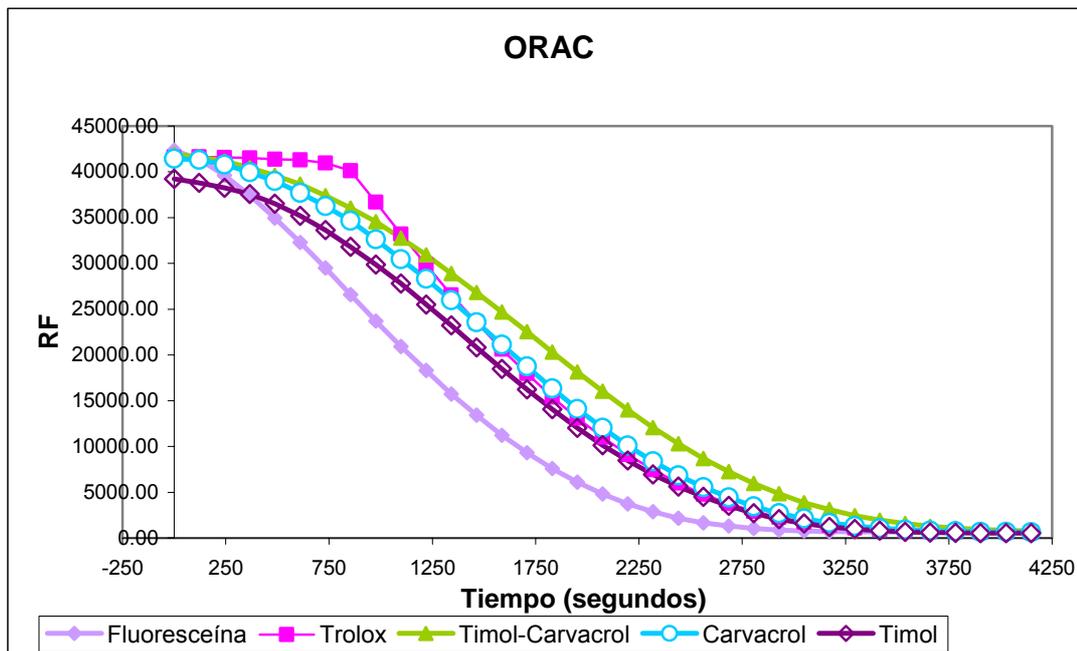


Figura 26. Capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC)

En la figura 26 se observa que las fracciones del aceite esencial de orégano como lo muestra el análisis actúan como antioxidantes, incrementando así el tiempo de degradación de la fluoresceína, mostrando que la fracción Timol-Carvacrol cuenta con mayor capacidad antioxidante que el control (Trolox).

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en el presente estudio es posible concluir que, el aceite esencial de orégano tiene propiedades antioxidantes.

Demostó poseer polifenoles en su estructura, siendo la fracción Carvacrol la que presenta un mayor contenido.

El aceite de pescado adicionado con las fracciones del aceite esencial incremento el tiempo de inducción, teniendo un mejor resultados con la fracción Timol a concentración 0.6%.

El Carvacrol extraído del aceite esencial de orégano, presentó un mejor efecto antioxidante que el Carvacrol al 98% obtenido comercialmente.

Las concentraciones 0.01, 0.02, 0.05, 0.1% de las 3 fracciones del aceite esencial de orégano lograron disminuir el índice de acidez e índice de peróxidos del aceite de canola, teniendo un mejor efecto las fracciones Timol al 0.01%, Carvacrol y Timol-Carvacrol a una concentración de 0.02% para la rancidez hidrolítica.

Para cada aceite comestible la concentración del aceite de orégano es variable, debido a que la naturaleza de cada aceite es diferente.

La fracción Timol presentó un mayor porcentaje de inhibición contra el radical libre DPPH, mientras que con el análisis de ORAC, la fracción Timol-Carvacrol tuvo una mayor capacidad antiradical.

RECOMENDACIONES

Se recomienda en la etapa I: estabilidad oxidativa método Rancimat analizar entre las concentraciones 0.7, 0.8 y 0.9% de la fracción Carvacrol, para conocer con exactitud que concentración es la que nos proporciona un mayor tiempo de inducción, y a partir de que concentración comienza a actuar como pro-oxidante.

En la etapa I rancidez hidrolítica, se cuenta con un porcentaje de ácido oléico debajo de 0 se sugiere hacer un estudio para conocer que compuestos se forman en este proceso.

CAPÍTULO VIII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMV Ediciones. 1988. Producción análisis y control de calidad de aceites y grasas comestibles. Ediciones Madrid.

Anónimo, extraído de la web el 09/06/08.

www.trd.cesca.es/TESIS_UdG/AVAILABLE/TDX-0524105-090845//Ticf.pdf

AOCS, American Oil Chemists' Society. 1963. Official and Tentative Methods of the American Oil Chemists' Society. 2nd ed. Chicago, Illinois.

Arcila Lozano C.C., Loarca-Piña G., Lecona-Urbe S., González de Mejía E. 2003. El orégano; propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. PROPAC. Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro. Dpto. de Ciencias de Alimentos y Nutrición Humana, University of Illinois, Urbana- Champaign.

Avalos García N.I. 2003. Evaluación química del proceso degradativo de los aceites de soya, maíz y girasol en la industria de las frituras. Tesis Ing. en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista Saltillo, Coahuila México.

Avello Marcia y Suwalsky Mario. 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Artículo AteneaNo. 494-II Sem. 161-172.

Badui Dergal S. 1999. Química de los alimentos. Ed. Pearson Educación. México, Df. Pp. 211- 278.

Betancort Rodríguez Juana Rosa. 2006. Evaluación de la actividad antioxidante de polifenoles de algas marinas. Facultad de Ciencias del Mar (Universidad de Las Palmas de Gran Canaria). España.

Catunga Casbis Alvaro. 2006. Aplicación de aceites esenciales del orégano (*Lippia berlandieri* Schaver) en carne de cerdo para su conservación. Tesis. Ing. en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista Saltillo, Coahuila México.

Chaquilla Q G, Torres MV, Ballinas C M L, Gastélum F M G, Silva V R, Nevárez M G. Actividad antioxidante del aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia berlandieri* Schauer) en sistemas alimenticios. Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Químicas. Edición especial no.1-2008. 3ra, Reunión nacional sobre orégano 2007.

C.H. Robinson, E.S. Weigley. 1986. Nutrición Básica y dietoterapia. Ediciones científicas. La Prensa Médica Mexicana, S.A.

Codex Alimentarius. 1993. Grasas y Aceites y productos derivados. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación Organización Mundial de la Salud. Roma.

CONAFOR. Revista Electrónica de la Comisión Nacional Forestal. Vegetación de México. 2000. Núm 26 publicación del 22 de Noviembre al 5 de diciembre. Pag. http://mexicoforestal.gob.mx/nuestros_arboles.php?id=29. Extraído el 26 de mayo del 2008.

Contreras C N, Martínez J R, Stashenko E E, 2006. Determinación de la actividad antioxidante in vitro de los aceites volátiles de cuatro plantas de uso tradicional mediante la medición de la peroxidación lipídica de aceite. Scientia et Technica Año XII, No 30, Mayo UTP. ISSN 0122-1701.

Cubero N., Monferrer A., Villalta J. 2002. Aditivos Alimentarios. Ediciones mundiprensa. A. Madrid Vicente. Pp 79-96.

Del Cid Aldana Nancy Elizabeth. 2005. Actividad de diecisiete extractos de doce plantas nativas guatemaltecas contra *Fonsecaea pedrosoi*. Informe de Tesis. Químico Biólogo. Universidad de San Carlos Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

Elmadfa Ibrahim, Muskat Erich, Fritzsche Doris. 1999. Guía de los aditivos, colorantes y conservadores. Manuales Integrales. Barcelona.

Gracia Nava Manuel Alejandro. Cuantificación de Fenoles y Flavonoides totales en extractos naturales. Universidad Autónoma de Querétaro.

Juárez Albarez René. 2006. Determinación de la calidad de aceite de orégano (*Lippia graveolens* H.B.K.) en diferentes rodales del ejido barreal de Guadalupe, Torreón Coahuila. Tesis Ing. en Agroecología. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna. Torreón Coahuila, México.

Kolola, J. Shah, M. 2006. Actividad de barrido de los radicales libres de *Inula cappa*. Department of Phytochemistry and Pahrmacognosy, L.M. College of Pharmacy, Naurangpura, Ahmedadab_380009, India.

Lawson Harry. 1999. Aceites y grasas Alimentarias Tecnología, utilización y nutrición. Edit. Acribia, S. A. Zaragoza España.

Lehninger Albert L. 1995. Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. 2da. Edición. Ediciones Omega, S.A. Barcelona.

M.A. Martinello y M. Pamparo. 2005. Poder Antioxidante de Extracto de Romero concentrado por destilación molecular. Universidad Nacional de Río Cuarto, Centro de Investigación y Transferencia de Tecnología (CITTEC).

Maldonado Rodríguez José Antonio. 1998. El orégano silvestre en México. Monografía. Ing. Agrónomo Fitotecnista. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista Saltillo, Coahuila México.

Morales Ángeles G. 2005. Aplicación de aceite esencial de orégano (*Limpia berlandieri* Shauer) como antimicrobiano en patógenos de importancia en la carne de res. Tesis Ing. En Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Sabater J, Sabater G. 2004. Ácidos grasos: importancia metabólica.

Silva Vázquez Ramón. 2003. El Orégano (Los nuevos caminos de la agricultura). Folleto técnico CONAZA. CIRENA (Centro de Investigación para los Recursos Naturales). Salaices, López, Chihuahua.

Singleton U L, Rossi Jr JA, 1965 Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic acid-Phosphotungstic acid reagents, *Am. J. Enol. Viticult.* 16:44-158

S. Martínez-Flores, J. González-Gallegos, J.M. Culebras y M.J. Tuñon. 2002. Flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Departamento de Fisiología, Universidad de León y Hospital de León. España. *Nutr. Hosp.* XVII (6) 271-278 ISSN 0212-1611. CODCN NUHUEQ S.U.R. 318.

Flores de Labardini Teresita, Ramírez de Delgado Arcelia. 1995. Química orgánica, Educación media superior. 8va. Edición. Editorial Esfinge. México.

Valenzuela B. A. and Nieto Susan. 1996. Antioxidantes sintéticos y naturales: protectores de la calidad de los alimentos. Instituto de la Grasa. *Revista Grasas y Aceites.* 47(3), 186-196.

Valenzuela B Alfonso, Sanhueza Julio y Nieto Susana. 2002. Natural antioxidants in functional foods: from food safety to health benefits. *Grasas y aceites* vol. 54. Fasc. 3, 295-303.

Valéria C. Ramalho y Neuza Jorge. 2008. Antioxidant action of Rosemary extract in soybean oil submitted to thermoxidation. *Grasas y Aceites*, 59 (2), Abril-Junio, 128,131, ISSN: 0017-3495.

ANEXO I

A. Metodología para la extracción del antioxidante Terbutil hidroxi-quinona (TBHQ) del aceite de canola marca capullo

1. Medir 200ml de aceite de canola marca capullo y 200ml de etanol 96^o.
2. Colocarlos en un embudo de separación de 500 ml.
3. Agitar la muestra por un espacio de 5 minutos aproximadamente, haciéndola homogénea.
4. Colocar el embudo en un soporte universal, dejando reposar por un lapso de 15 minutos.
5. Observar las dos fases, como se muestra en la figura.
6. Separar las fases cuidadosamente, conservando la fase inferior y desechando la fase superior.



Figura A. Extracción del antioxidante Terbutil hidroxi-quinona (TBHQ)

B. Metodología para la determinación de antioxidantes por el método: Capacidad secuestrante del radical estable DPPH siguiendo la técnica OSU, FAPC: Food and Agricultural Products Center, 2008.

1. Preparar una solución estándar disolviendo 50 mg de DPPH en 100 ml de metanol (0.50 mg/ml). Diluir esta concentración mezclando 0.5 ml de la solución estándar en 9.5 ml de metanol, haciendo la concentración 0.025mg/ml (6×10^{-5} M de DPPH ó 60 μ M: fórmula peso del DPPH es 394)
2. Igualmente disolver 0.25 ml, 0.75 ml, y 1 ml del la solución estándar en 9.75 ml, 9.25 ml y 9 ml de metanol, teniendo así 30 μ M, 90 μ M, y 12. μ M de DPPH.
3. Agregar 2ml de cada una de las diferentes concentraciones preparadas del DPPH en la celdilla y lea la absorbancia para obtener la curva de calibración
4. Mezclar 240 mg de aceite de orégano en un matraz de aforación de 10ml y complete hasta la marca con metanol. Ahora diluya 1ml de la solución estándar con 9 ml de metanol hacienda la concentración 2.4 mg/ml (equivaliendo 2.4 g/L)
5. Añadir 2ml de 60 μ M DPPH, 50uL de la solución de orégano y lea la absorbancia a 517Nm durante 60 min cada 30 segundos (En el espectrofotómetro DU520)
6. Igualmente preparar para 30 μ M, 60 μ M, 90 μ M y 120 μ M la concentración de BHT, o BHA. (Por la fórmula del BHT es 220y BHA es 180, disuelva 130mg/10ml de BHT y 108 mg/10ml de BHA en metanol: diluir dos veces 0.5ml, 1ml, 1.5ml y 2ml de la solución estándar en un matraz de aforación de 10ml y a complete con metanol)
7. Preparar un poco más de la concentración en caso de ser necesario
8. Seguir el mismo paso mencionado en el punto 5
9. Calcular el % de DPPH en estado estable con BHT y BHA utilizando la curva de calibración del DPPH.
10. Calcular EC₅₀ que es la concentración de antioxidante.
11. En caso del aceite de orégano siga la siguiente fórmula.

$$\% \text{ Inhibición} = ((A_{C(o)} - A_{A(t)}) / A_{C(o)}) \times 100$$

Donde: $A_{C(0)}$ = Absorbancia control (DPPH + sin antioxidante) al $t = 0$

$A_{A(t)}$ = absorbancia de la muestra $t = 60$ min

C. Determinación de antioxidantes por el método Capacidad de absorción de radicales libre de oxígeno (ORAC), siguiendo la metodología OSU, FAPC 314, Fruit & Vegetable Products Lab, elaborado y modificado por: Yannis Oikonomakos, 2008.

Excitación: 485 nm y Emisión: 535nm Temperatura de análisis: 36°C

Preparación de soluciones:

• **Buffer Fosfato (PB)**

Agua destilada: 1,080 ml

Fosfato de potasio (K_2HPO_4): 8.567 g, disolver en ~70 ml de agua (de los 1,080 ml)

Fosfato de Sodio (Na_2HPO_4): 4.384 g, disolver en ~ 50 ml de agua (de los 1, 080 ml)

Mezcle todo y ajuste a un pH 7 (Manténgase en refrigeración)

• **Fluoresceina (FL)**

1. Pesar 0.125 g en 1000 ml del Buffer Fosfato (solución estándar de fluoresceina)

2. Diluir 2ml en 125 ml con PB teniendo así la solución estándar diluida FL.

3. Mantener 0.0125 gr in 100ml siempre cubierto con papel aluminio

Cuando lo use:

1. Diluir 1 en 10: 1 dilución estándar de FL/ 9 Buffer Fosfato (v/v)

2. Diluir 2 ml de la dilución estándar de FL/18 ml de Buffer Fosfato una vez que se utilice

3. Mantener en oscuridad (Puede cubrirse con aluminio)

• **Estándar de ácido 2 carboxílico 6 hidroxil 2,5,7,8 tetrametilcromo (Trolox)**

1. Pesar 5mg en 200 ml de PB siendo la solución estándar de Trolox (100uM)

2. Colocar 1.2~ 1.3 ml hasta 1.5 ml en un tubo para centrifuga y enfrien.

Cuando se utilice:

1. Medir 1ml Solución estándar de Trolox/ 19 ml PB (v/v)----- 5uM Trolox

2. Medir 1ml solución estándar de Trolox/ 9 ml PB (v/v)-----10 uM Trolox
3. Medir 2ml solución estándar de Trolox/ 11.34 (2x5.67) ml PB (v/v)----- 15uM Trolox
4. Medir 2ml solución estándar de Trolox/ 8 ml PB (v/v)----- 20uM Trolox

- **2,2'-Azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH)**

Siempre prepare muestra fresca

1. Pesar 0.332 g en 10 ml Buffer Fosfato
2. Colocar en un plato Falcon 48-celdas (limpio), como se muestra en la tabla 4:

Procedimiento:

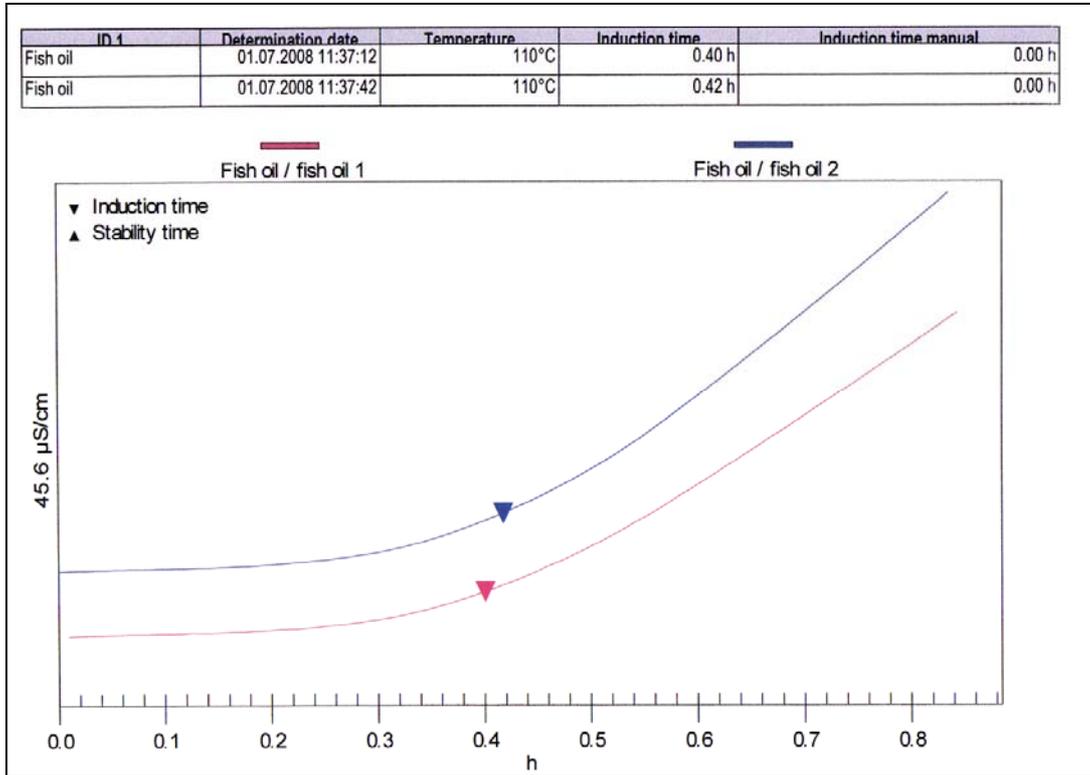
1. Coloque el blanco (PB) o la muestra estándar de (Trolox) 20 μ L
2. Coloque 160 μ L FL en cada celdilla
3. Coloque 20 μ L de AAPH en cada celda lo más rápido posible. (asegúrese de que el aparato ya esté trabajando)

Nota:

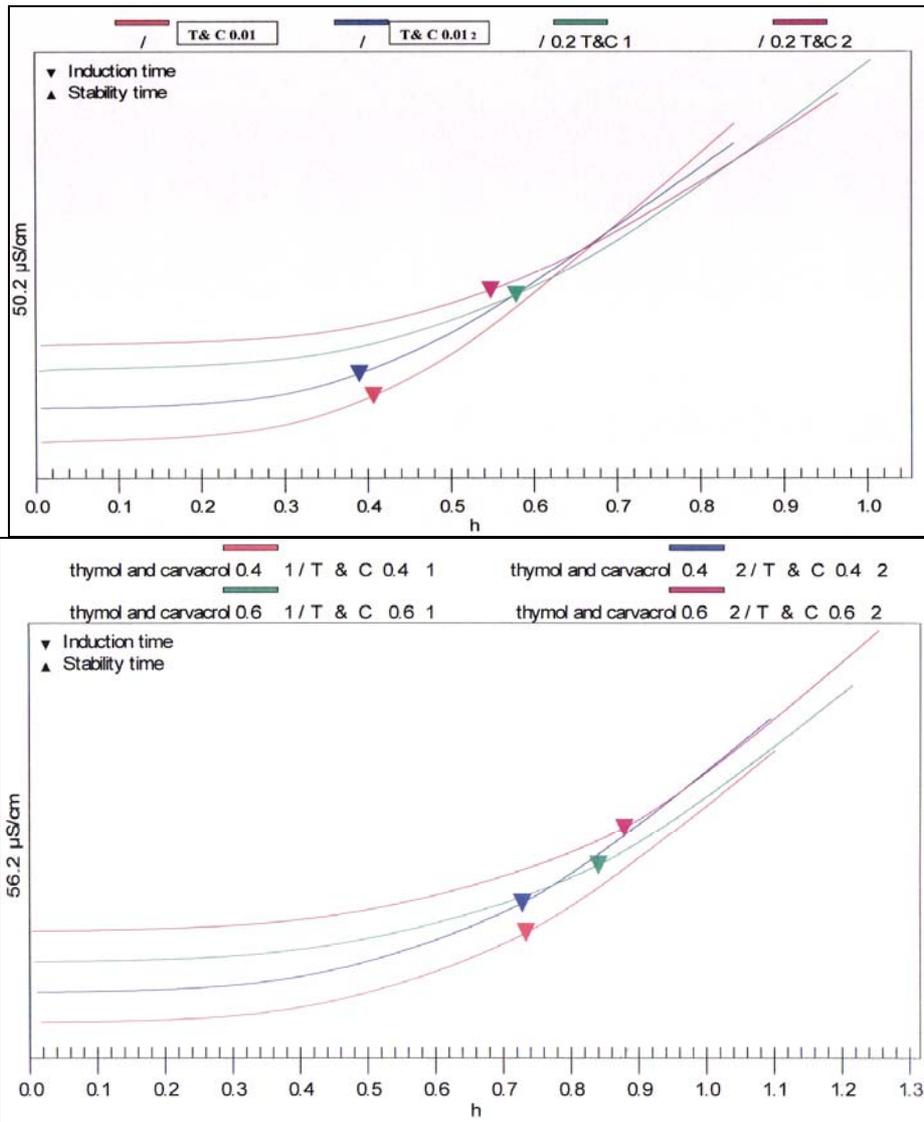
1. Diluir el aceite de orégano.
2. Pesar 10 μ L en un matraz de aforación de 5 ml.
3. Completar hasta la marca con (Acetona 50% y agua 50%), anotar el peso.
4. Tomar 25 μ L de ésta solución y colocarla en un matraz de aforación de 25 ml, y completar con Buffer Fosfato, haciendo la dilución (1:1000)

ANEXO II

Gráficas de estabilidad oxidativa (método Rancimat)

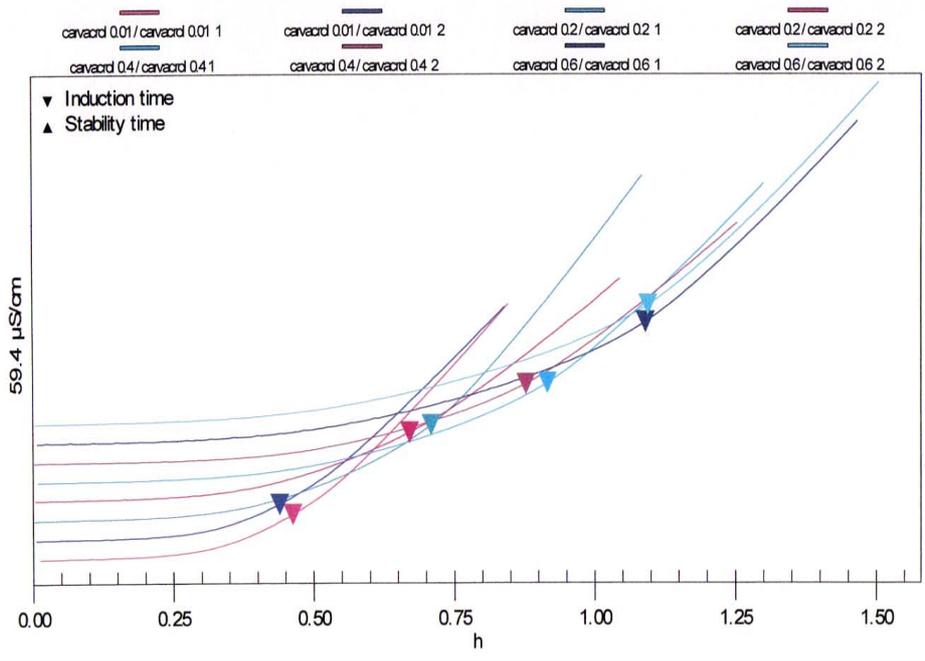


Tiempo de inducción del aceite de pescado.



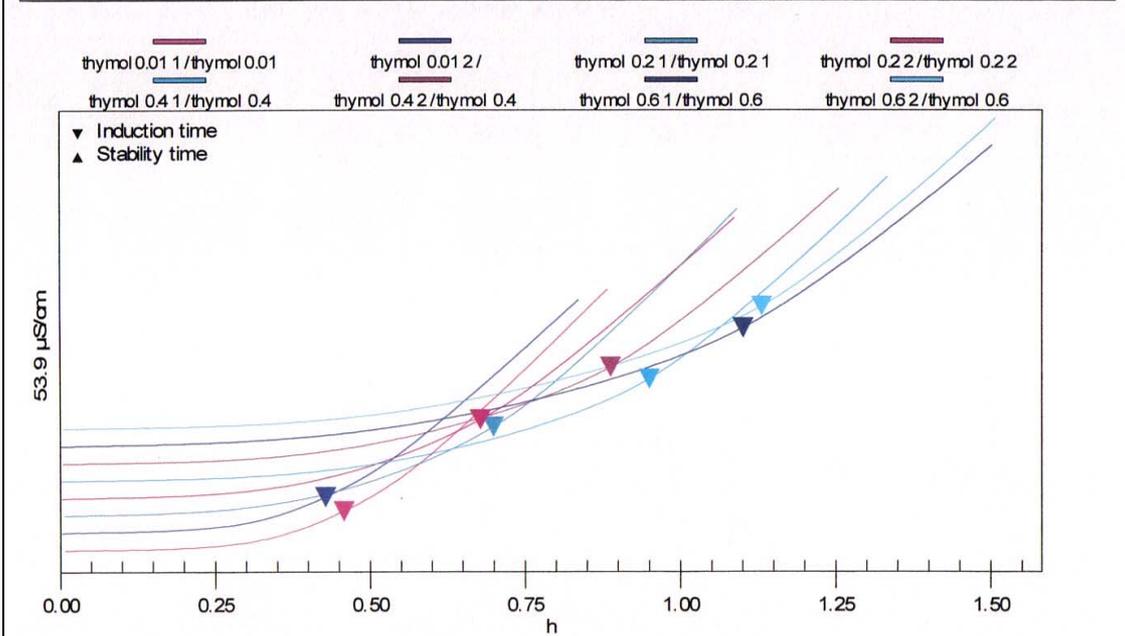
Tiempo de inducción del aceite esencial de orégano fracción Timol-Carvacrol

ID 1	Determination date	Temperature	Induction time automatic	Induction time manual
carvacrol 0.01	18.06.2008 9:34:08	110°C	0.46 h	0.00 h
carvacrol 0.01	18.06.2008 9:34:33	110°C	0.44 h	0.00 h
carvacrol 0.2	18.06.2008 9:34:51	110°C	0.71 h	0.00 h
carvacrol 0.2	18.06.2008 9:35:09	110°C	0.67 h	0.00 h
carvacrol 0.4	18.06.2008 9:35:25	110°C	0.92 h	0.00 h
carvacrol 0.4	18.06.2008 9:35:43	110°C	0.88 h	0.00 h
carvacrol 0.6	18.06.2008 9:35:57	110°C	1.09 h	0.00 h
carvacrol 0.6	18.06.2008 9:36:11	110°C	1.10 h	0.00 h



Tiempo de inducción del aceite esencial de orégano fracción Carvacrol

ID 1	Determination date	Temperature	Induction time	Induction time manual
thymol 0.01 1	18.06.2008 13:18:24	110°C	0.46 h	0.00 h
thymol 0.01 2	18.06.2008 13:18:42	110°C	0.43 h	0.00 h
thymol 0.2 1	18.06.2008 13:18:55	110°C	0.70 h	0.00 h
thymol 0.2 2	18.06.2008 13:19:10	110°C	0.68 h	0.00 h
thymol 0.4 1	18.06.2008 13:19:22	110°C	0.95 h	0.00 h
thymol 0.4 2	18.06.2008 13:19:35	110°C	0.89 h	0.00 h
thymol 0.6 1	18.06.2008 13:19:48	110°C	1.10 h	0.00 h
thymol 0.6 2	18.06.2008 13:20:00	110°C	1.13 h	0.00 h



Tiempo de inducción del aceite esencial de orégano fracción Timol

ANEXO III

Tablas de análisis de varianza T-Student.

Tabla A. Tiempo de inducción del aceite de pescado sin adición y adicionado con las fracciones del aceite de orégano.

Nivel																			Mínimo cuadrado medio
aceite de pescado,0.6	A																		.
aceite de pescado,0.4		B																	.
aceite de pescado,0.2			C																.
aceite de pescado,0.01				D															.
T,0.4					E														0.9200000
C,0.4					E	F													0.9000000
T/C,0.6						F													0.8600000
T/C,0.4							G												0.7300000
C,0.2							G												0.6900000
T,0.2							G												0.6900000
T/C,0.2								H											0.5650000
aceite de pescado,0									I								M		0.4100000
T/C,0										J									.
T,0.6											K								1.1150000
T/C,0.01									I										0.4000000
T,0												L							.
C,0.6											K								1.0950000
C,0.01																	M		0.4500000
T,0.01										I							M		0.4450000
C,0																	N		.

Tabla B. Tiempo de inducción del aceite de pescado adicionado con Carvacrol del aceite esencial así como Carvacrol comercial.

Nivel												Mínimo cuadrado medio
C 98%,2	A											.
C 98%,1		B										.
C 98%,0.6			C									0.5550000
C 98%,0.4				D								.
C 98%,0.2					E							.
C 98%,0.01						F						.
C,0.6							G					1.0950000
C,0.4								H				0.9000000
C,0.2									I			0.6900000
C,2										J		0.6400000
C,1										J		0.6050000
C,0.01											K	0.4500000

Tabla C. Índice de peróxidos de aceite de canola con y sin antioxidante

Nivel				Mínimo cuadrado medio
IP Ac. Comer,2	A			4.5000000
IP Ac. Comer,16	A			4.5000000
IP S. Antiox,16	A			4.4995000
IP S. Antiox,12	A	B		4.0005000
IP S. Antiox,22	A	B		4.0005000
IP S. Antiox,20	A	B		4.0005000
IP S. Antiox,24	A	B		4.0000000
IP S. Antiox,4	A	B		4.0000000
IP S. Antiox,18	A	B		4.0000000
IP Ac. Comer,6	A	B		4.0000000
IP Ac. Comer,14	A	B		4.0000000
IP Ac. Comer,10	A	B	C	3.5005000
IP S. Antiox,2	A	B	C	3.5000000
IP Ac. Comer,4	A	B	C	3.5000000
IP Ac. Comer,12	A	B	C	3.5000000
IP S. Antiox,8	A	B	C	3.5000000
IP S. Antiox,14	A	B	C	3.5000000
IP S. Antiox,6		B	C	3.0005000
IP Ac. Comer,0		B	C	3.0000000

IP Ac. Comer,22		B	C	3.0000000
IP S. Antiox,0		B	C	3.0000000
IP S. Antiox,10		B	C	3.0000000
IP Ac. Comer,24		B	C	3.0000000
IP Ac. Comer,8			C	2.5000000
IP Ac. Comer,18			C	2.5000000
IP Ac. Comer,20			C	2.4995000

Tabla D. Índice de Acidez del aceite de canola con antioxidante y sin antioxidante

Nivel									Mínimo cuadrado medio
IA Ac. Comer,18	A								0.18300000
IA S. Antiox,18		B							0.15500000
IA S. Antiox,22		B							0.15500000
IA S. Antiox,12		B	C						0.14100000
IA S. Antiox,14			C	D					0.12700000
IA Ac. Comer,14			C	D					0.12700000
IA S. Antiox,16			C	D					0.12700000
IA S. Antiox,20			C	D					0.12700000
IA Ac. Comer,2				D	E				0.11300000
IA Ac. Comer,10				D	E				0.11300000
IA Ac. Comer,12				D	E				0.11300000
IA S. Antiox,4				D	E				0.11300000
IA S. Antiox,10				D	E				0.11300000
IA Ac. Comer,20				D	E				0.11300000
IA Ac. Comer,0					E	F			0.09900000
IA S. Antiox,24					E	F			0.09900000
IA Ac. Comer,16					E	F			0.09900000
IA Ac. Comer,22					E	F			0.09900000
IA S. Antiox,6						F	G		0.08500000
IA Ac. Comer,8						F	G		0.08500000
IA S. Antiox,8						F	G		0.08500000
IA Ac. Comer,4						F	G		0.08500000
IA Ac. Comer,24						F	G		0.08500000
IA S. Antiox,2						F	G		0.08500000
IA S. Antiox,0							G	H	0.07050000
IA Ac. Comer,6								H	0.05600000

Tabla E. Índice de Acidez fracción Timol-Carvacrol concentración 0.01, 0.02, 0.05, 0.1%, aceite de canola con y sin antioxidante

Nivel											Mínimo cuadrado medio
0.05 TC,56	A										0.1832157
Comercial,56		B									0.1131616
S/ antiox.,56		B									0.1129813
Comercial,32			C								0.0565913
S/ antiox.,32			C								0.0564981
S/ antiox.,48			C								0.0564665
Comercial,8			C								0.0563184
S/ antiox.,8			C								0.0562704
S/ antiox.,24			C	D							0.0424271
0.05 TC,8			C	D							0.0423183
0.05 TC,48			C	D							0.0422907
Comercial,48				D	E						0.0285509
Comercial,24				D	E						0.0284313
0.02 TC,56				D	E						0.0281918
0.02 TC,8				D	E						0.0281608
0.02 TC,32				D	E						0.0281524
0.01 TC,56					E	F					0.0141041
0.01 TC,8					E	F					0.0141027
0.02 TC,24					E	F					0.0140491
0.05 TC,32					E	F					0.0140183
0.05 TC,24					E	F					0.0140082
0.01 TC,32						F	G				0.0000034
0.1 TC,0						F	G				0.0000000
0.05 TC,0						F	G				0.0000000
0.01 TC,0						F	G				-0.0000000
0.02 TC,0						F	G				-0.0000000
Comercial,0						F	G				-0.0000000
S/ antiox.,0						F	G				-0.0000000
0.02 TC,48						F	G				-0.0000085
0.01 TC,24						F	G				-0.0000114
0.01 TC,48							G	H			-0.0140908
0.1 TC,32								H			-0.0282699
0.1 TC,8									I		-0.0705180
0.1 TC,48									I		-0.0846042
0.1 TC,24									I		-0.0846101
0.1 TC,56										J	-0.2537493

**Tabla F. Índice de Acidez fracción Carvacrol concentración 0.01, 0.02, 0.05, 0.1%,
aceite de canola con y sin antioxidante**

Nivel												Mínimo cuadrado medio
0.1 C,56	A											0.1410500
Comercial,56	A	B										0.1131616
S/ antiox.,56	A	B										0.1129813
0.1 C,32		B	C									0.0986820
0.1 C,48			C	D								0.0704232
Comercial,32				D	E							0.0565913
S/ antiox.,32				D	E							0.0564981
S/ antiox.,48				D	E							0.0564665
Comercial,8				D	E							0.0563184
S/ antiox.,8				D	E							0.0562704
S/ antiox.,24				D	E	F						0.0424271
0.1 C,8				D	E	F						0.0422744
Comercial,48					E	F	G					0.0285509
Comercial,24					E	F	G					0.0284313
0.02 C,48					E	F	G					0.0282169
0.1 C,24					E	F	G					0.0281745
0.01 C,56					E	F	G					0.0281615
0.02 C,32						F	G	H				0.0141093
0.01 C,32						F	G	H				0.0140830
0.02 C,56							G	H	I			0.0000309
0.02 C,24							G	H	I			0.0000241
0.01 C,24							G	H	I			0.0000182
S/ antiox.,0							G	H	I			0.0000000
0.05 C,0							G	H	I			0.0000000
0.01 C,0							G	H	I			0.0000000
Comercial,0							G	H	I			0.0000000
0.1 C,0							G	H	I			-0.0000000
0.02 C,0							G	H	I			-0.0000000
0.01 C,48								H	I			-0.0141001
0.02 C,8								H	I			-0.0141055
0.01 C,8								H	I			-0.0141285
0.05 C,56									I			-0.0282759
0.05 C,8										J		-0.0847020
0.05 C,48										J	K	-0.0987293
0.05 C,32										J	K	-0.1128500
0.05 C,24											K	-0.1269617

Tabla G. Índice de acidez fracción Timol concentración 0.01, 0.02, 0.05, 0.1%, aceite de canola con y sin antioxidante

Nivel										Mínimo cuadrado medio
Comercial,56	A									0.1131616
S/ antiox.,56	A									0.1129813
0.1 T,32	A									0.0986549
Comercial,32		B								0.0565913
S/ antiox.,32		B								0.0564981
S/ antiox.,48		B								0.0564665
0.01 T,32		B								0.0563820
0.05 T,56		B								0.0563717
Comercial,8		B								0.0563184
S/ antiox.,8		B								0.0562704
S/ antiox.,24		B	C							0.0424271
Comercial,48		B	C	D						0.0285509
Comercial,24		B	C	D	E					0.0284313
0.1 T,48		B	C	D	E					0.0282671
0.01 T,56		B	C	D	E					0.0282296
0.1 T,8		B	C	D	E					0.0282186
0.01 T,8		B	C	D	E					0.0282144
0.01 T,48		B	C	D	E					0.0282118
0.01 T,24			C	D	E	F				0.0141223
0.05 T,8			C	D	E	F				0.0140753
0.02 T,8			C	D	E	F				0.0140396
0.02 T,24				D	E	F	G			0.0000090
0.01 T,0					E	F	G			0.0000000
0.02 T,0					E	F	G			0.0000000
S/ antiox.,0					E	F	G			0.0000000
Comercial,0					E	F	G			-0.0000000
0.05 T,0					E	F	G			-0.0000000
0.1 T,0					E	F	G			-0.0000000
0.1 T,24						F	G	H		-0.0140600
0.02 T,32						F	G	H		-0.0140901
0.02 T,56						F	G	H		-0.0140989
0.05 T,32						F	G	H		-0.0142148
0.02 T,48							G	H		-0.0281846
0.05 T,48							G	H		-0.0282287
0.05 T,24								H		-0.0423479
0.1 T,56									I	-0.1973092

Tabla H. Índice de acidez mejores concentraciones con las diferentes fracciones del aceite esencial de orégano

Nivel							Mínimo cuadrado medio
Comercial,56	A						0.1131616
S/ antiox.,56	A						0.1129813
Comercial,32		B					0.0565913
S/ antiox.,32		B					0.0564981
S/ antiox.,48		B					0.0564665
0.01 T,32		B					0.0563820
Comercial,8		B					0.0563184
S/ antiox.,8		B					0.0562704
S/ antiox.,24		B	C				0.0424271
Comercial,48			C	D			0.0285509
Comercial,24			C	D			0.0284313
0.01 T,56			C	D			0.0282296
0.02 C,48			C	D			0.0282169
0.01 T,8			C	D			0.0282144
0.01 T,48			C	D			0.0282118
0.02 TC,56			C	D			0.0281918
0.02 TC,8			C	D			0.0281608
0.02 TC,32			C	D			0.0281524
0.01 T,24				D	E		0.0141223
0.02 C,32				D	E		0.0141093
0.02 TC,24				D	E		0.0140491
0.02 C,56					E	F	0.0000309
0.02 C,24					E	F	0.0000241
S/ antiox.,0					E	F	0.0000000
0.01 T,0					E	F	0.0000000
Comercial,0					E	F	0.0000000
0.02 C,0					E	F	-0.0000000
0.02 TC,0					E	F	-0.0000000
0.02 TC,48					E	F	-0.0000085
0.02 C,8						F	-0.0141055