

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



**Evaluación del efecto antioxidante y antimicrobiano de los residuos
de orégano (*Lippia graveolens*).**

Por:

VIVIANA ROSALES ALEMÁN

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título profesional de:

Ingeniero en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Noviembre de 201

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**Evaluación del efecto antioxidante y antimicrobiano de los
residuos de orégano (*Lippia graveolens*).**

TESIS

Por:

VIVIANA ROSALES ALEMÁN

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

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

El presente trabajo ha sido dirigido por el siguiente comité:



Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez

Asesor Principal



MC. María Hernández González

Coasesor

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Noviembre de 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Por:

VIVIANA ROSALES ALEMÁN

Que se somete a la consideración del H. jurado examinador como
requisito para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

APROBADO

Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez
Presidente del Jurado

MC. Mildred Inna M. Flores Verástegui
Sinodal

Dr. Mario A. Hernández Cruz
Sinodal

Dr. Armando Robledo Olivo
Sinodal Suplente

Dr. José Duñez Alanís
Coordinador de la División de Ciencia Animal



Buenavista, Saltillo, Coahuila México. Noviembre 2015.

Dedicatorias

A Dios:

Por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

A mis padres:

Sofía Alemán García y Santiago Rosales Montero por haberme apoyado a lo largo de mi estudio, por su comprensión, esfuerzo y apoyo incondicional; porque si no fuera por ellos no hubiera sido posible este triunfo.

A mis hermanos:

Israel, Esperanza, René, Julio y a mi hermano Luis que aunque ya no esté físicamente con nosotros vive por siempre en nuestro corazón, gracias por su comprensión, apoyo y cariño.

A mi novio:

Marco Herrera por siempre estar a mi lado en las buenas y en las malas; por su comprensión, paciencia y amor, dándome ánimos de fuerza y valor para seguir adelante.

A mis amigos:

De la generación CXVIII de ICTA, gracias por su amistad y confianza, sinceramente deseo que donde quiera que vayan tengan una vida llena de éxitos.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a Dios por haberme dado la sabiduría, el entendimiento y la fortaleza para poder llegar al final de mi carrera, por no haber dejado que me rindiera en ningún momento e iluminarme para salir adelante.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por haberme dado la oportunidad de realizar mis estudios en ella, siempre recordaré con mucho respeto y cariño.

A Mi Familia por ser ese motor inmenso de apoyo incondicional durante la vida y mi estancia universitaria; hoy este logro fue posible gracias a su cariño y apoyo. Mi inspiración y esfuerzo es el fruto de su amor.

A la Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez por la confianza depositada al encomendarme la realización de este proyecto del cual me siento muy orgullosa de haber formado parte, gracias por su paciencia, disposición y apoyo.

Así mismo agradezco a la maestra Mildred Marcela Flores Verástegui, al Dr. Armando Robledo Olivo, a la M.C. María Hernández González por su apoyo, disposición y sugerencias para la culminación de este proyecto.

Al Dr. Mario Alberto Cruz Hernández, por su valioso apoyo, por su tiempo que me dedicó para la realización de esta investigación, por sus sabios consejos y su sincera amistad.

Al Centro de Investigación para los Recursos Naturales (CIRENA), ubicado en la comunidad de Salaices, López, Chihuahua, por haber prestado sus instalaciones para realizar una parte de este proyecto.

A la Q.F.B Magdalena Olvera Esquivel encargada de los laboratorios del Departamento de Alimentos por el apoyo brindado al proporcionar el material utilizado en esta investigación.

Contenido

ÍNDICE DE CUADROS	6
ÍNDICE DE FIGURAS	8
RESÚMEN	10
CAPÍTULO I.....	12
INTRODUCCIÓN	12
JUSTIFICACIÓN	13
Objetivo general	14
Objetivo específicos	14
HIPOTESIS	14
CAPÍTULO II.....	15
REVISIÓN DE LITERATURA.....	15
2.1 Generalidades de Orégano	15
2.1.1 Importancia Económica del orégano	17
2.1.2 Actividad biológica de los componentes del orégano	18
2.1.2.1 Antimicrobiano.....	18
2.1.2.2 Antioxidante.....	19
2.1.3 Principales usos del orégano	20
2.1.3.1 Usos Medicinales	20
2.1.3.2 Uso en Perfume	21
2.1.3.3 Usos culinarios	21
2.1.3.4 Usos potenciales en la agricultura.....	22
2.2 <i>Lippia graveolens</i>	22
2.2.1 Taxonomía del género Lippia.....	23
2.2.2 Descripción botánica.....	24
2.2.3 Ubicación geográfica de Lippia	25
2.2.4 Clima y suelo	26
2.2.5 Composición química.....	26
2.3 Aceites esenciales.....	28
2.4 Métodos de obtención de extracto y aceites esenciales.....	30
2.4.1 Métodos convencionales.....	30

2.4.1.1	Destilación con agua (hidrodestilación)	30
2.4.1.2	Uso de solventes	31
2.4.1.3	Destilación por arrastre con vapor de agua	31
2.4.2	Métodos alternativos	32
2.4.2.1	Ultrasonidos en la hidrodestilación	32
2.4.2.2	Extracción por microondas	33
2.4.2.3	Extracción con fluidos en estado supercrítico	34
CAPÍTULO III		36
MATERIALES Y MÉTODOS		36
3.1	Localización del experimento	36
3.2	Materiales y equipo de laboratorio.....	36
3.2.1	Material Biológico	36
3.2.2	Materiales de Laboratorio	36
3.3	Metodología experimental	38
3.3.1	Etapa I. Obtención de los extractos.	38
3.3.1.1	Agua.....	38
3.3.1.2	Solventes orgánicos (etanol y hexano).....	39
3.3.2	Etapa II. Caracterización Físicoquímica de los Extractos	40
3.3.2.1	Cromatografía en fase gaseosa acoplada a espectrometría de masas 40	
3.3.2.2	Colorimetría.....	41
3.3.2.3	Refractometría (índice de refracción)	43
3.3.3	Etapa III. Determinación de la actividad antimicrobiana	44
3.3.3.1	Viabilización e identificación de cepas microbianas	44
3.3.3.2	Valoración de la eficiencia antimicrobiana.....	45
3.3.4	Etapa IV. Determinación de la actividad antioxidante de los extractos	46
3.3.4.1	Espectrofotometría	46
4.1	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
4.1.1	Etapa I. Extracción de los extractos	48
4.1.2	Etapa II. Características físico-química.....	49
4.1.2.1	Cromatografía en fase gaseosa acoplada a espectrometría de masas 49	
4.1.2.2	Colorimetría.....	51
4.1.2.3	Refractometría (índice de refracción)	53
4.1.3	Etapa III. Determinación de la actividad antimicrobiana	54

4.1.3.1	Viabilización e identificación de cepas bacterianas	54
4.1.3.2	<i>Aspergillus niger</i>	55
4.1.3.3	<i>Penicillium</i>	55
4.1.3.4	Valoración de la eficiencia antimicrobiana	56
4.1.4.1	Espectrofotometría	58
CAPITULO V		59
CONCLUSIONES		59
CAPÍTULO VI		60
BIBLIOGRAFÍA		60
CAPITULO VII		67
ANEXOS 1		67
	Análisis de colorimetría de extractos de orégano	67
ANEXO 2		68
	Análisis de la determinación del índice de refracción.	68
ANEXO 3		69
	Curva de calibración para cuantificación de los fenoles, con ecuación lineal.	69
ANEXO 4		69
	Curva de Calibración para cuantificación de flavonoides, con ecuación lineal.	69

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Distribución y características de las especies conocidas como orégano en México.	16
Cuadro 2.	Producción de Orégano en el estado de Durango.	18
Cuadro 4.	Componentes químicos del aceite esencial de orégano que determinan su calidad comercial. Análisis comparativo con dos especies extranjeras.....	27
Cuadro 5.	Parámetros analíticos empleados en el control de calidad de aceites esenciales	29
Cuadro 6.	Materiales empleados en los diferentes análisis realizados al orégano (<i>Lippia graveolens</i>)	37
Cuadro 7.	Reactivos utilizados en los diferentes análisis realizados a los residuos de orégano (<i>Lippia graveolens</i>).	37

Cuadro 8. Equipo utilizado en los análisis del orégano (<i>Lippia graveolens</i>) describiendo marca y modelo de cada uno.	38
Cuadro 9. Composición en g/100ml de medio.....	45
Cuadro 10. Tiempos de retención de los compuestos identificados en los extractos mediante GC.....	50
Cuadro 11. Valore medios y desviación estándar de las coordenadas de L*a*b* de los extractos de orégano.	51
Cuadro 12. Diámetros (mm) de halos de inhibición de los extractos de residuos vegetales de orégano.....	57
Cuadro 13. Concentración (mg/ml) de sustancias antioxidantes en los extractos de residuos vegetales de orégano.	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Orégano Mexicano (<i>Lippia Graveolens</i>).....	23
Cuadro 3. Clasificación taxonómica del orégano.	23
Figura 2. Flores de orégano (<i>Lippia graveolens</i>).....	24
Figura 3. Frutos (cápsulas) de <i>Lippia graveolens</i> en la planta (izquierda) y separados listos para remover las semillas (derecha).	24
Figura 4. Distribución geográfica aproximada del orégano <i>Lippia</i> (tomado de García, 2012)	25
Figura 5. Estructuras químicas de los componentes principales del orégano mexicano (Arcila-Lozano y col., 2004)	27
Figura 6. Método de Hidrodestilación.....	31
Figura 7. Destilación por arrastre de vapor.	32
Figura 8. Diseño preliminar de la Hidrodestilación asistida por microondas.	34
Figura 9. Principio de la Extracción por Fluidos Supercríticos.....	35
Figura 10. Diagrama de bloques para obtener los extractos utilizando agua como solvente.	39
Figura 11. Diagrama de bloques de la extracción con solventes.	39
Figura 12. Equipo de cromatografía de gases.....	41
Figura 13. Modelo CIELab para determinar coordenadas a^*b^*	42
Figura 14. Equipo utilizado en la medición de colorimetría	43
Figura 15. Refractómetro utilizado para medir el índice de refracción.....	44
Figura 16. Espectrofotómetro implementado para cuantificación de fenoles y flavonoides.	47
Figura 17. Extractos de orégano (<i>Lippia Graveolens</i>)	48
Figura 18. Cromatogramas de extractos de orégano a partir diferentes tamaños de partícula (M_1 y M_2) de residuos vegetales obtenidos por diferentes métodos: a) Hidrodestilación, b) Etanol; c) Hexano.....	50
Figura 19. Identificación de los extractos en el diagrama del sistema de notación $L^*a^*b^*$	52
Figura 20. Colorimetría de extractos de orégano <i>Lippia graveolens</i>	52
Figura 21. a) Morfología macroscópica y b) microscópica de <i>Escherichia coli</i>	54

Figura 22. a)Morfología macroscópica y b) microscópica de <i>Aspergillus niger</i>	55
Figura 23. Morfología macroscópica de <i>Penicillium</i>	56
Figura 24. Antibiogramas de los extractos obtenidos por el uso de diferentes solventes aplicados a diferentes tamaños de partícula (M ₁ y M ₂) de residuos vegetales de orégano.....	57

RESÚMEN

El orégano es una de las riquezas florísticas con las que cuenta el territorio mexicano; se conoce su utilización desde tiempos ancestrales como planta medicinal y como condimento de platillos regionales, la cual ha sido poco estudiada en comparación con el orégano del mediterráneo (*Origanum vulgare*). El orégano mexicano (*Lippia graveolens*) se encuentra en aprox. 24 estados del país, sus componentes químicos principales son el timol, el carvacrol y el p-cimeno, a los cuales se le atribuyen actividades antioxidantes y antimicrobianas, además de que son los responsables del olor característico (Silva-Vázquez y col., 2008). Sin embargo, poco se sabe de la composición química de los residuos de orégano, los cuales se estima que corresponden a un 60% y 70% de la cosecha anual en México, siendo principalmente utilizados como composta (Ángulo y col; 2004).

En este trabajo se evaluó la factibilidad del aprovechamiento de los residuos de la industria oreganera para la extracción de compuestos con actividad antioxidante y antimicrobiana, con la finalidad de que tengan una aplicación en la industria de los alimentos. Se utilizaron los métodos convencionales de obtención de los extractos tales como la hidrodestilación y uso de solventes orgánicos como son el etanol y el hexano (Bandoni, 2000). Éstos métodos fueron aplicados a residuos de dos tamaños de partículas, se tamizaron previamente utilizando dos mallas metálicas No. 8 (2.38mm de abertura) y No. 40 (0.420mm de abertura), con la finalidad de tener dos tamaños de partícula de los residuos denominándose M1 (+ malla 8) y M2 (+ malla 40).

Se determinó la capacidad antioxidante con espectrofotometría mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu de acuerdo al método descrito por Zhishen y col; (1999). Además de analizar cualitativamente la eficiencia antimicrobiana de cada extracto mediante la técnica de antibiograma utilizando la metodología normalizada de Kirby Bauer (Maye Bernal, 1984), en la bacteria *Escherichia Coli*, el resultado fue positivo al utilizar el extracto etanólico y en los hongos *Aspergillus nigger* y *Penicillum*, el efecto antimicrobiano fue negativo.

Los extractos se caracterizaron fisicoquímicamente a partir de parámetros como el color, índice de refracción y cromatografía de gases donde en los extractos

etanólicos se determinó la presencia del compuesto p-Cimeno mientras con el extracto obtenido a partir del hexano, el componente presente fue el γ -terpineno .

La muestra M_1 (+malla 8) presenta mayor poder antimicrobiano y antioxidante con respecto a la M_2 (+Malla 40), esto puede ser debido al tamaño de partícula de la materia prima sometida a la extracción, la muestra M_1 puede contener hojas y fracciones de la planta que contengan más aceite que la M_2 .

Palabras claves: *Residuos de orégano, Antioxidantes y Antimicrobianos.*

Correo Electronico; Viviana Rosales Alemán, Viviana_4_2@hotmail.com

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El orégano es un recurso ampliamente utilizado a nivel nacional e internacional. En México es un producto forestal no maderable de gran interés socioeconómico principalmente para las zonas áridas y semiáridas. Anualmente se aprovechan más de 6500 t de hoja seca lo que deja una ganancia económica superior a los 160 millones de pesos por exportación del 90% de ésta. Los principales compradores de este recurso son Estados Unidos, que importa alrededor de 6500 t/año de hoja seca; la Unión Europea, 4400 t/año; Brasil 1330 t/año y Uruguay que requiere 115 t/año (Silva, R. 2005); demanda a la cual México contribuye a satisfacer aportando aproximadamente el 35% de la producción mundial.

La colecta del orégano se realiza en época de lluvias durante los meses de septiembre a octubre. En ésta se corta hasta el 75% del arbusto que incluye el ramaje con hojas (SEMARNAT, 2009). Sin embargo, únicamente se comercializa la hoja, la cual de acuerdo a García, G. y Ortega, S. (2007) representa aproximadamente el 40% de la planta, por lo que el resto se desecha completamente convirtiéndose en un residuo vegetal (60% aprox.). Cuando se realiza la extracción del aceite esencial a partir de las hojas de orégano por el método de destilación por arrastre de vapor de agua, se genera otro residuo al que se le conoce como “bagazo”, formado por las hojas que quedan después de la extracción (Rolando,2007), que de acuerdo a Ross y Sombrero, citado por SEMARNAT, 2001 constituyen aproximadamente el 90% en peso seco de su peso inicial.

Actualmente existe una creciente demanda del orégano, específicamente al aceite esencial contenido en su hoja debido a sus aplicaciones antisépticas, expectorantes, diuréticas y sudoríficas, además de ser utilizado principalmente como condimento de alimentos, así como en la elaboración de diversos productos de

beneficio a la salud. Lo anterior ha despertado el interés de recolectores mexicanos por extraer y vender éste aceite para incrementar las ganancias obtenidas por la venta de la hoja, ya que 1L de aceite esencial de orégano tiene un valor en el mercado internacional superior a los US\$180.

A pesar de existir reportes de que, para complementar la cadena de aprovechamiento del orégano, tanto los residuos generados durante su recolección (tallos) como los obtenidos en la extracción del aceite esencial (bagazo de la hoja), han sido empleados para la elaboración de compostaje y con esto mejorar las propiedades físicas y químicas del suelo (Corral y col; 2011), no se han caracterizado los componentes químicos presentes en los residuos vegetales (tallos), y al no ser sometidos a métodos de extracción previos como en es el caso del bagazo de la hoja, pueden ser aprovechados representando un ingreso extra para recolectores mexicanos, al comercializarse. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es evaluar el efecto antioxidante y antimicrobiano de los residuos vegetales de orégano.

JUSTIFICACIÓN

El aprovechamiento del orégano con fines farmacéuticos, cosméticos, de perfumería y alimentaria tiene su origen a partir de la recolección de sus hojas, su comercialización en el mercado local y/o la extracción de aceites para la elaboración de diferentes productos. Sin embargo, de la cosecha anual de orégano en México, solamente del 30 al 40% es utilizado para esta finalidad, mientras que del 60 al 70% restante está formado por residuos empleados únicamente como composta. Por tal razón, la caracterización de los residuos de orégano es de gran importancia para dilucidar algunas otras propiedades tales como la capacidad antioxidante y el poder antimicrobiano de los extractos presentes en estos, de esta forma lograr el aprovechamiento integral de la planta de orégano.

Objetivo general

Determinar la capacidad antioxidante y antimicrobiana de los extractos presentes en los residuos de orégano para futuras aplicaciones en la industria de los alimentos y lograr el aprovechamiento integral de la planta de orégano.

Objetivo específicos

- Obtener los extractos de dos tamaños de partícula de residuos mediante el uso de solventes: agua, etanol y hexano, estos dos últimos de naturaleza orgánica.
- Caracterizar físicoquímicamente los extractos.
- Determinar la capacidad antioxidante de los extractos por su contenido en polifenoles y secuestro de radicales libres
- Determinar cualitativamente la actividad antimicrobiana y antifúngica de cada extracto de orégano sobre microorganismos de importancia alimentaria (*E. Coli*, *A. Nigger*, *Penicillium*)

HIPOTESIS

El extracto presente en los residuos de orégano (*Lippia Graveolens*) posee actividad antioxidante y es capaz de inhibir el crecimiento de microorganismos fúngicos y bacteriológicos de importancia en la industria alimentaria.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades de Orégano

El nombre de orégano proviene del griego “oros” (montaña) y “ganos” (ornamento), la decoración o la belleza de las montañas (Muñoz, 2002), es una planta originaria de México, conocida con varios nombres como orégano del cerro, O. cimarrón O. silvestre, O. mexicano, mejorana (Flores, 1991). Planta arbustiva aromática con una altura que varía de 0.20 a 2m; presenta tallos leñosos muy ramificados desde la base, con hojas oblongas o elípticas, finamente crenadas, muy tomentosas y pilosas; sus flores están dispuestas en espigas subglobosas con corolas blancas zigomorfas y con cuatro estambres; sus frutos son dehiscentes (Granados y col; 2013).

En México, un gran número de especies vegetales silvestres se utilizan como orégano y su importancia se relaciona con las propiedades organolépticas (Granados y col; 2013). La germinación de sus semillas ocurre en una semana bajo condiciones de capacidad de campo y temperatura de 15 a 20 °C. En el lapso de un año, alcanza alturas promedio de 0.15 m; después de cinco años, las plantas desarrolladas en condiciones naturales llegan a medir alrededor de 0.90 m. A dicha edad, las plantas ya son adecuadas para su cosecha, aunque en algunas regiones pueden ser aprovechadas al tercer e incluso al segundo año. (Martínez, 1994)

En la República Mexicana, la planta de orégano se distribuye ampliamente, en zonas tropicales, templadas áridas y semiáridas. Se encuentran en estado silvestre en al menos 24 estados del país y se tienen identificadas alrededor de 40 especies de plantas popularmente conocidas como “orégano”, pertenecientes a cuatro familias botánicas: Asteraceae (Compositae), Lamiaceae (Labiatae), Fabaceae (Leguminoseae) y Verbenaceae (Huerta, 1997). En el cuadro 1 se muestra la distribución y características de las especies de orégano en nuestro país.

Cuadro 1. Distribución y características de las especies conocidas como orégano en México.

Especie	Familia	Distribución	Características
Gardoquia micromeroides Helms	Labiatae	Guadalázar, San Luis Potosí	Subarbusto de alrededor de 0.30 m; hojas opuestas, sésiles, linear-oblongas o angostamente lanceoladas de 6 a 18 mm. Flores bilabiadas, azules, solitarias y axilares, cáliz morado.
Hedoma floribunda tandl.	Lamiaceae	Sonora, Guicorichi, Chihuahua	Planta herbácea de hojas opuestas, aromáticas; flores bilabiadas de color lila pálido.
Hedoma patens Jones	Lamiaceae	Chihuahua	Planta herbácea pequeña de hojas opuestas, aromáticas, flores bilabiadas de color lila.
Hyptis albida HBK	Lamiaceae	Sinaloa, Chihuahua, Guanajuato, Guerrero, S L P	Arbusto de 1.5 a 4 m, estrellado tomentoso, de hojas lanceoladas-oblongas-ovadas, agudas o acuminadas de 2.6 cm, crenado aserradas: flores espigado-paniculadas; cáliz, corola azul bilabiada con cuatro estambres.
Lantana involucrata L.	Verbenaceae	Lugares de clima cálido en casi todo el país	Arbusto de 50 cm a 4 m; hojas opuestas, ovadas u oblongas ovadas o elípticas toscamente crenadas, ásperas arriba, de 1 a 6 cm; flores lilas o blancas pequeñas tubulosas, con el tubo de 6 a 8 mm; fruto azul de 3 mm.
Lantana velutina Mart et al.	Verbenaceae	Lugares de clima cálido en casi todo el país	Arbusto aromático hasta de 1 m; hojas opuestas, crenadas de 1.5 a 3.5 cm; flores blancas en cabezuelas largamente pedunculadas. Las hojas secas se usan como condimento.
Lippia berlandieri Schauer	Verbenaceae	Durango, Puebla, Gro, Coahuila, Tamaulipas, Veracruz, Oaxaca, Zacatecas, S. L. P., Querétaro, Hidalgo, Jalisco, Chih. y Sin.	Arbusto aromático de 1 a 2.5 m; hojas opuestas, aromáticas de 1.5 a 3.5 cm; flores blancas en cabezuelas largamente pedunculadas. Las hojas secas se usan como condimento.
Lippia graveolens HBK	Verbenaceae	Yucatán y Campeche.	Arbusto o arbolillo hasta de 9 m; de hojas opuestas ovado oblongas o lanceolado oblongas, crenadas aromáticas; flores monopétalas en cabezuelas.
Lippia palmeri Wats	Verbenaceae	Baja California, Sonora y Sinaloa.	Arbusto hasta de 2 m; hojas opuestas ovadas redondeadas, de 1 a 2.5 cm, toscamente aserradas, aromáticas; flores monopétalas, blancas en cabezuelas de 13 mm
Monarda austromontana Epling.	Lamiaceae	Sonora	Planta herbácea de hojas opuestas aromáticas; flores blancas bilabiadas, con manchas rojas en la garganta.
Monarda citriodora Cerv.	Lamiaceae	Chihuahua y Nuevo León	Planta herbácea de hojas lineares o angostamente lanceoladas de 4 cm, olorosas; flores moradas en cabezuelas.
Origanum vulgare L.	Lamiaceae	Introducida en todo México y cultivada en Guerrero, originaria del mediterráneo europeo	Planta herbácea de hojas opuestas, anchamente ovadas, con la base subcordada aromáticas, que se usan como condimento. Este nombre además de referirse al verdadero orégano, en México se aplica a varias plantas del género Lippia, que comprende algunas especies cuyas hojas se usan como condimento.

Brickellia veronicaefolia (H. B. K.) Gray. Field or hill oregano	Compositae	Coahuila, Oaxaca, México y Puebla.	Planta arbustiva de unos 80 cm. De hojas opuestas, de 4 a 15 mm, ovadas de borde crenado, con peciolo de 3 a 6 mm; flores azulosas o algo rosadas en cabezuelas de 12 a 17 mm.
Dalea greggo Gray Cimarron oregano	Leguminosae	Sonora, San Luis Potosí, Puebla y Oaxaca.	Arbusto con ramas tomentoso-sedosas; hojas pinnadas con 5 a 11 hojuelas obovadas u ovales de 3 a 10 mm. Densamente sedoso; flores papilionadas de 1 a 3 cm, gruesas, cáliz y hojas con glándulas; flores rosadas con el estandarte amarillo; fruto vellosos.

(Huerta 1997).

La mayor producción de orégano para fines comerciales es la del género *Lippia*, cuyas especies más abundantes en México son *Lippia berlandieri* Schauer y *Lippia graveolens* H.B.K.

La familia Verbenaceae se considera de mayor importancia de acuerdo a su distribución y a sus características aromáticas. En el Noroeste de México, el orégano del género *Lippia* spp, es la especie que más se comercializa debido a su abundancia y su distribución (CONAFOR, 2011).

2.1.1 Importancia Económica del orégano

El orégano es un recurso ampliamente utilizado a nivel nacional e internacional. En México es un producto forestal no maderable de gran interés socioeconómico principalmente para las zonas áridas y semiáridas. Anualmente se aprovechan más de 6500 t de hoja seca lo que deja una ganancia económica superior a los 160 millones de pesos por exportación del 90% de ésta. Los principales compradores de este recurso son Estados Unidos, que importa alrededor de 6500 t/año de hoja seca; la Unión Europea, 4400 t/año; Brasil 1330 t/año y Uruguay que requiere 115 t/año (Silva, 2005); demanda a la cual México contribuye a satisfacer aportando aproximadamente el 35% de la producción mundial.

El comercio del orégano mexicano se realiza principalmente con Estados Unidos, al cual se exporta alrededor del 85% de la producción nacional; el 10% va al mercado doméstico y el 5% a países europeos y asiáticos. La aceptación del orégano mexicano se explica por su calidad, expresada en su gran poder saborizante (CONABIO, 2005).

México ocupa el segundo lugar como productor mundial de orégano con la especie *L. graveolens* H. B. K. Sin embargo, la mayoría de las especies explotadas son silvestres y su cultivo es aún tradicional y limitado (García y col, 2012). El estado de Durango es de los principales productores de orégano en el país con un promedio anual de 1636.8 toneladas (ver cuadro 2).

Cuadro 2. Producción de Orégano en el estado de Durango.

AÑO	TONELADAS
2005	1,863
2006	1,976
2007	1,628
2008	1,755
2009	962
PROMEDIO ANUAL	1,636.8

(SEMARNAT, 2009)

La producción mundial de orégano genera un valor comercial aproximado de \$22.5 millones de dólares; no obstante la Comisión Nacional Forestal (CONAFOR) estimó que en 2005 las ventas totales de orégano sumaron más de \$75 billones de euros (CONAFOR, 2009). El mayor productor de orégano en el mundo es Turquía, con exportaciones que superan las 10 000 toneladas anuales, seguido por México, Grecia y otros países (Villavicencio y col., 2007). El mayor consumidor de orégano es Estados Unidos de América quien importa 6 mil toneladas anuales (García y col; 2012). Otros países productores son: Israel, Francia, Marruecos, Albania, República Dominicana, Canadá, Egipto, España, Chile, Perú, Argentina, entre otros (CONABIO, 2005).

2.1.2 Actividad biológica de los componentes del orégano

2.1.2.1 Antimicrobiano

Existen múltiples estudios sobre la actividad antimicrobiana de los extractos de diferentes tipos de orégano. Se ha encontrado que los aceites esenciales de las

especies del género *Origanum* presentan actividad contra bacterias gram negativas como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica* y *Enterobacter cloacae*; y las gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus subtilis* (Aligiannis N y col; 2001).

Tiene además capacidad antifúngica contra *Cándida albicans*, *C. tropicalis*; *Torulopsis glabrata*, *Aspergillus Níger*, *Geotrichum* y *Rhodotorula*; pero no contra *Pseudomona aeruginosa* (Sivropoulou A y col; 1996)

Los fenoles carvacrol y timol poseen los niveles más altos de actividad contra microorganismos gram negativos, excepto para *P. aeruginosa*, siendo el timol más activo (Arcila-Lozano y col; 2004). Otros compuestos, como el γ -terpineno y p-cimeno no mostraron actividad contra las bacterias estudiadas (Aliaginianis y Col;2001),(Sivropoulou A y col; 1996)

2.1.2.2 Antioxidante

Una de las actividades biológicas del orégano es su capacidad antioxidante, especialmente en especies del género *Oreganum* (Arcila-Lozano y col; 2004). La función antioxidante de diversos compuestos en los alimentos ha atraído mucha atención en relación con el papel que tienen en la dieta en la prevención de enfermedades (Arcila-Lozano y col; 2004). Los compuestos antioxidantes son importantes porque poseen la capacidad de proteger a las células contra el daño oxidativo, el cual provoca envejecimiento y enfermedades crónico-degenerativas, tales como el cáncer, enfermedad cardiovascular y diabetes. Los antioxidantes como los tocoferoles, los carotenoides, el ácido ascórbico y los compuestos fenólicos se consumen a través de los alimentos. En algunos estudios de especias se han aislado una amplia variedad de compuestos antioxidantes fenólicos (Azuma K. 1999).

El potencial antioxidante de los extractos de orégano ha sido determinado por su capacidad para inhibir la peroxidación lipídica, protegiendo al ADN del daño por radicales hidroxilo, con los métodos de atrapamiento de peróxido de hidrógeno, atrapamiento de HOCl y por la prueba de la rancidez. La actividad antioxidante depende del tipo y polaridad del solvente extractante, (Moure A y col, 2001). El aceite esencial de *O. vulgare* tiene actividad anti-radical y esta propiedad se le atribuye a los monofenoles carvacrol y timol (Arcila-Lozano y col; 2004). Varios investigadores confirman el potencial antioxidante de extractos y aceites esenciales de diferentes variedades de orégano (*O. vulgare*, *O. compactum*, *O. majorana*) (Arcila-Lozano y col; 2004)

Un estudio reciente (Zheng, W. Et al. 2002. Journal of Agricultural and Food Chemistry) sobre hierbas culinarias y medicinales identificó al orégano como la hierba con la más alta actividad antioxidante, mayor que la vitamina E. (Agro Diario, 2005)

2.1.3 Principales usos del orégano

En la actualidad, el orégano tiene una amplia gama de usos, en todas sus formas aprovechables. A continuación se describen algunas de las utilidades de esta peculiar especie.

2.1.3.1 Usos Medicinales

Tradicionalmente, la parte de la planta de orégano que se destina al uso médico es la parte aérea de la misma, prescindiendo, para obtener un producto de calidad, de la parte inferior de los tallos que suelen estar lignificados y contienen pocos principios activos (Klauer, 2009).

Según la OMS, 80% de la población mundial utiliza extractos vegetales para cuidados primarios de la salud (Ávila-Sosa Sánchez, 2001).

Según reporta la CONABIO (2005), la parte utilizada son las hojas frescas y secas, la forma de preparación: Infusión acuosa, 0.5%; sus aplicaciones:

Antiasmático (control del asma); antiespasmódico (alivio de cólicos); antitusígeno (control de la tos y del asma); antihelmíntico (contra lombrices, en mezcla con yerbabuena y tomillo); antiinfeccioso (acción específicamente contra *Staphylococcus aureus*); emenagogo (regulador de la menstruación); fungicida (acción contra *Candida albicans*).

Su aceite esencial es usado como medio de enjuague para las curaciones de los dientes. Como uso externo, la loción es beneficiosa para las várices y para la gota, el reumatismo y las articulaciones rígidas. La esencia tiene propiedades desinfectantes y cicatrizantes frente a infecciones dérmicas debido a sus propiedades antiinfecciosas, antibacterianas y antisépticas.

Posee actividad contra piojos, antimalaria, anti Giardia, actividad estrogénica, antigenotóxica (anticarcinogénica), actividad detoxificante, y antimutagénica. También ha demostrado ser analgésico, antiinflamatorio, antipirético, sedante, antidiarreico, antifúngico, diurético (la infusión de hojas), antihipertensivo, repelente, antiespasmódico y anestésico local. Además es útil en el tratamiento de infecciones cutáneas, desórdenes hepáticos, desórdenes menstruales, enfermedades respiratorias, sífilis y gonorrea. Su consumo durante el embarazo no debe ser excesivo, pues se le han atribuido propiedades abortivas (Ávila-Sosa Sánchez, 2001).

2.1.3.2 Uso en Perfume

La esencia de orégano entra dentro de la composición de diversos perfumes, en la fabricación de jabones y cosméticos (Agro Diario, 2005).

2.1.3.3 Usos culinarios

El empleo del orégano como condimento figura como uno de los usos más arraigados y tradicionales de esta planta. Con mayor frecuencia, se han empleado las hojas y sus sumidades floridas en culinaria para dar sabor y aroma a toda suerte de carnes estofadas y, especialmente, en la salazón de carnes de cerdo. También se usa mucho para aliñar aceitunas, en este caso, junto con tomillo, pobrella, serpol, ajadrea y otras hierbas. El orégano es el condimento que se ha hecho famoso en el

condimento de la pizza. De las sumidades floridas también se pueden obtener una bebida dulce, aperitiva, muy digestiva (Klauer, 2009).

2.1.3.4 Usos potenciales en la agricultura

El aceite de orégano posee actividad antiparasítica contra insectos, ácaros, hongos, bacterias, nemátodos y plagas que atacan granos almacenados y contra *Musca domestica* (Isman, 2000 y Prates, 1998).

En México existen diversas especies de orégano, pero *Lippia graveolens* es la más importante por la magnitud del potencial existente y por los volúmenes que de ésta se comercializan (CONAFOR, 2011). A continuación se describe a detalle las características de mayor relevancia para esta especie, ya que con ella se trabajó en la presente investigación.

2.2 *Lippia graveolens*

Es una especie arbustiva caducifolia (que tira sus hojas al no haber humedad en el suelo) perenne, que llega a alcanzar hasta 2 metros de altura y 1 metro de diámetro de cobertura foliar, muy ramificado, con un crecimiento relativamente rápido y un ciclo de vida corto (de entre cinco y diez años). Se distribuye extensamente en los climas semiáridos de México y de América Central y es resistente a la sequía (Mata-González y Meléndez-González, 2005). Aunado a lo anterior, el orégano de monte se encuentra preferentemente en la vegetación secundaria, lo que sugiere cierta tolerancia a la perturbación.



Figura 1. Orégano Mexicano (*Lippia Graveolens*)

2.2.1 Taxonomía del género *Lippia*

El género *Lippia* familia Verbenaceae incluye aproximadamente 200 especies de hierbas, matorrales y árboles pequeños . Sin embargo, el término orégano se refiere aproximadamente- a 40 especies de plantas herbáceas que comparten características similares de olor y sabor, y comprenden más de un grupo taxonómico (familias Verbenaceae y Labiatae), lo cual repercute en la cantidad y el tipo de sustancias activas que poseen (Silva-Vázquez y col; 2008). La clasificación taxonómica del orégano del género *Lippia graveolens* se muestra en el cuadro 3.

Cuadro 3. Clasificación taxonómica del orégano.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsidae
Orden	Lamiales
Familia	Verbenaceae
Género	<i>Lippia</i>

(Sánchez y col., 2007; SEMARNAT, 2001; CONAFOR, 2011)

2.2.2 Descripción botánica

La floración se comienza unas siete semanas después de iniciada la formación del follaje, éstas son pequeñas, de color blanco y forman inflorescencias en racimos; además tiene la característica de autopolinizarse. (Huerta 1997).



Figura 2. Flores de orégano (*Lippia graveolens*).

Los frutos son cápsulas secas donde se encuentran las semillas, las cuales son de color café, de forma ovoide y de un tamaño menor al medio milímetro (Martínez, 1990). Empiezan a formarse de dos a tres semanas después de iniciada la floración, el tiempo de maduración coincide con el de amarillamiento y caída de las hojas, variando el periodo de acuerdo con la zona geográfica, aunque de manera general esto ocurre entre octubre y noviembre, periodo recomendable para coleccionar la semilla (Huerta, 1997).



Figura 3. Frutos (cápsulas) de *Lippia graveolens* en la planta (izquierda) y separados listos para remover las semillas (derecha).

Las semillas son de color café, de forma ovoide y de tamaño menor a 0.5 milímetros. Se ha estimado que en un kilogramo existen alrededor de 2'100,000 semillas. Bajo condiciones óptimas de humedad y de temperatura (15 a 20°C), la semilla germina después de una semana.

2.2.3 Ubicación geográfica de Lippia

En el territorio mexicano se puede encontrar orégano silvestre en 24 estados de la República, principalmente en las regiones áridas y semiáridas de los Estados de Querétaro, Guanajuato, Hidalgo, Oaxaca, Jalisco, San Luis Potosí, Zacatecas, Chihuahua, Durango, Sinaloa, Baja California Sur y Coahuila (Silva-Vázquez y col., 2008).

En los sitios donde crece el orégano, el suelo tiene de 5 a 35 cm de profundidad con una textura franco arenosa (50-60%, 20-30% limo, 10-25% de arcilla) (Silva-Vázquez y col., 2008).

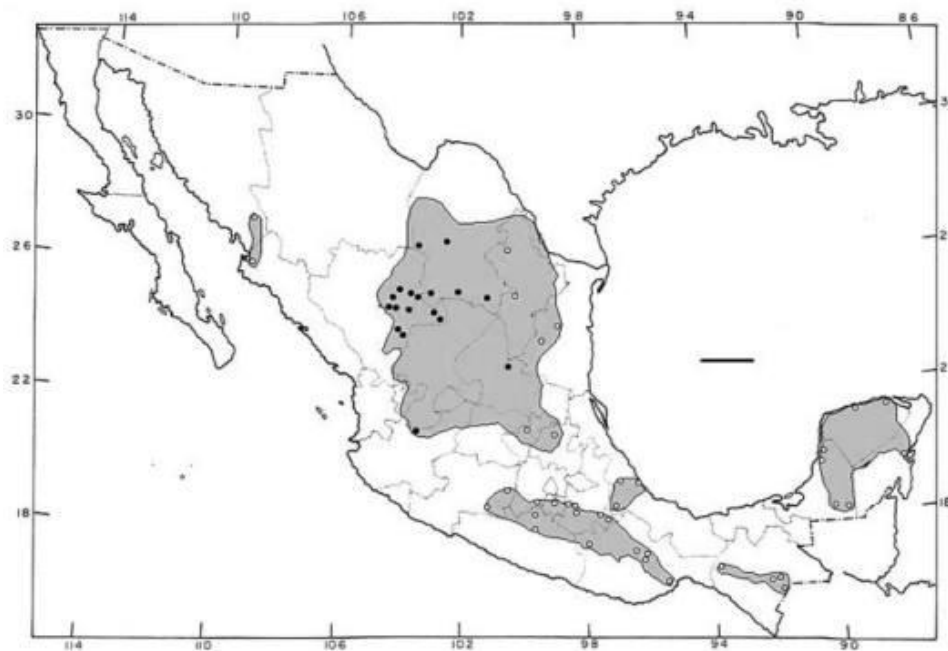


Figura 4. Distribución geográfica aproximada del orégano Lippia (tomado de García, 2012)

2.2.4 Clima y suelo

El cultivo del orégano tiene éxito en todos los tipos de terreno ricos en materia orgánica, síliceos arcillosos, francos, humíferos, calcáreos, arcilloso –arenoso e incluso en lugares áridos. Los mejores resultados, tanto cualitativos como cuantitativos, se obtienen en las zonas cálidas del sur.

Los mayores rendimientos en aceite esencial, tanto cuantitativamente como cualitativamente, se obtienen en zonas bien soleadas y cuya altitud no sea excesiva de 1400 a 1600 msnm, es donde se encuentra la mayor parte del orégano, en suelos pedregosos con pH de 7.3 a 7.6 con clima seco semicálido y precipitaciones no mayores a los 300mm de promedio anual en el verano; con heladas que ocurre con frecuencia entre mediados de octubre a marzo (Silva, 2003; Morales, 2005).

2.2.5 Composición química

La composición química del orégano es compleja y depende de la época de colecta, la fenología de la planta y la altitud del lugar de crecimiento. En comparación con el orégano europeo, el orégano mexicano posee hojas más oscuras, además de un olor y un sabor más fuerte. Así mismo, se sabe que la concentración del timol y el carvacrol es mayor en plantas jóvenes, aunque dicho valor no se afecta por la cantidad de agua que recibe la planta durante su desarrollo (Silva y Dunfor, 2003).

Las sustancias químicas son fáciles de obtener y analizar en el aceite esencial del orégano, mientras que su concentración es una de las variables utilizadas para la clasificación genética entre especies. En su gran mayoría, los compuestos más abundantes son los monoterpenos y los ácidos fenólicos (Silva-Vázquez y col., 2008). Los monoterpenos son compuestos volátiles con olores intensamente pungentivos, responsables de las fragancias y las sensaciones de olor-sabor de muchas plantas; estructural y biológicamente son muy diferentes, llegando a clasificárseles hasta en 35 grupos. Los principales quimiotipos de la especie *Lippia* son el carvacrol y el timol, cada uno con enzimas específicas que

dirigen su biosíntesis (*Lippia graveolens*) es la que contiene más concentración de carvacrol, entre las diversas especies conocidas y estudiadas de orégano (ver Figura 5).

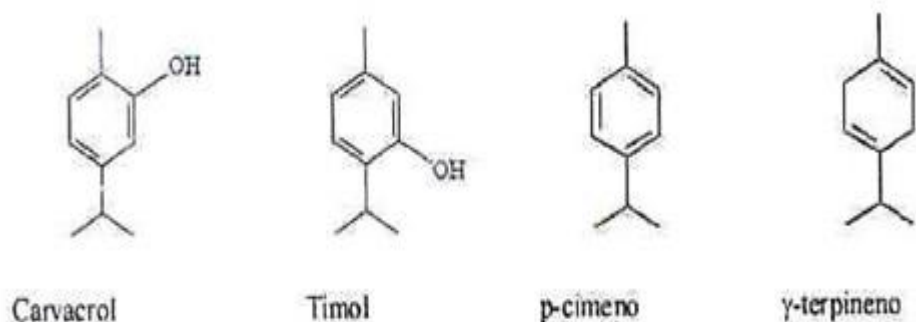


Figura 5. Estructuras químicas de los componentes principales del orégano mexicano (Arcila-Lozano y col., 2004)

De igual manera, los hidrocarburos monoterpénicos γ -terpineno y p-cimeno (precursores del timol y el carvacrol, respectivamente) están presentes de manera constante en los aceites esenciales, pero siempre en cantidades menores a las de timol y carvacrol. En el cuadro 4, se muestran las sustancias principales que se obtienen del orégano mexicano.

Cuadro 4. Componentes químicos del aceite esencial de orégano que determinan su calidad comercial. Análisis comparativo con dos especies extranjeras

Componentes	Orégano mexicano (<i>Lippia graveolens</i>)	Oregano griego (organum vulgare, subsp. Hirtum)	Orégano turco (organum vulgare, subsp. Gracite)
Aceite esencial	2.0%	1.5%	1.5%
Timol	10.4%	23.9%	15.1%
carvacrol	43.7%	12.2%	9.9%
p-cimeno	6.4%	15.9%	8.1%

(Silva-Vázquez y Col., 2008).

2.3 Aceites esenciales

Los aceites esenciales son mezclas de varias sustancias químicas biosintetizadas por las plantas, que dan el aroma característico a algunas flores, árboles, frutos, hierbas, especias, semillas y a ciertos extractos de origen animal. Se trata de productos químicos intensamente aromáticos, no grasos (por lo que no se enrancian), volátiles por naturaleza (se evaporan rápidamente) y livianos (poco densos). Son insolubles en agua, levemente solubles en vinagre, y solubles en alcohol, grasas, ceras y aceites vegetales. Se oxidan por exposición al aire. Se han extraído más de 150 tipos, cada uno con su aroma propio y virtudes curativas únicas. Para que den lo mejor de sí, deben proceder de ingredientes naturales brutos y quedar lo más puro posible (Contreras, 2010).

El principal producto derivado de la hoja de orégano es el aceite esencial, el cual tiene usos en las industrias: licoreras, refresqueras, farmacéuticas y de cosmetología. Al igual que la hoja seca de orégano, el principal mercado del aceite esencial son Estados Unidos de Norteamérica, Italia y Japón (CONAFOR, 2005). Los aceites esenciales tienen una enorme cantidad de usos y se obtienen tanto de plantas cultivadas como de plantas silvestres. En 1998, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés) estimó que existen alrededor de 3,000 aceites esenciales conocidos a nivel mundial, de los cuales aproximadamente el 10 % tienen importancia comercial. (Contreras, 2010).

La especie y aceites esenciales son empleados en la industria alimentaria, como agentes naturales para prolongar la vida útil de los alimentos. Una amplia variedad de plantas y de especies presentan componentes antimicrobianos y se usan para reducir o eliminar bacterias patógenas e incrementar la calidad de los productos alimenticios. Los agentes antimicrobianos de las plantas se obtienen por varios métodos a partir de aceites aromáticos y líquidos volátiles de flores, yemas, semillas, hojas, cortezas, madera, frutos y raíces de plantas. Existen más de 1340 plantas con compuestos con definida acción antimicrobial y más de 30 000

compuestos que han sido aislados a partir de grupos- fenol contenido en compuestos oleáceos y que son usados en la industria alimenticia. Sin embargo la comercialización y caracterización con propiedades como conservador solo están disponibles para un número reducido de aceites esenciales. La utilización como conservador de alimentos de especies y sus aceites esenciales como agentes naturales, se ha enfocado o extendido principalmente a prolongar la vida de anaquel de los alimentos, reduciendo o eliminando a las bacterias patógenas e incrementando la calidad de los productos alimenticios (Burt, 2004). Para determinar la calidad de los aceites esenciales se utilizan numerosos parámetros analíticos, los cuales se muestran en el cuadro 5.

Cuadro 5. Parámetros analíticos empleados en el control de calidad de aceites esenciales

Descripción	Parámetros
1. Características organolépticas	<ul style="list-style-type: none"> • Olor • Color • Apariencia
2. Determinaciones físicas	<ul style="list-style-type: none"> • Densidad • Poder rotatorio • Índice de refracción • Miscibilidad en etanol • Punto de congelación • Punto de inflamación • Rango de destilación
3. Índices químicos	<ul style="list-style-type: none"> • Índice de acidez • Índice de éster • Índice de saponificación • Índice de acetilo • Índice de fenoles
4. Características cromatográficas	<ul style="list-style-type: none"> • Perfil cromatográfico por CG • Cuantificación de los principales componentes
5. Características espectroscópicas	<ul style="list-style-type: none"> • Ultravioleta – visible

	<ul style="list-style-type: none"> • Infrarrojo
6. Otras determinaciones	<ul style="list-style-type: none"> • Pesticidas • Metales pesados

(Albarracín y Gallo, 2003).

2.4 Métodos de obtención de extracto y aceites esenciales

2.4.1 Métodos convencionales

Dentro de estos métodos, los cuales son los más comúnmente utilizados, se encuentran la hidrodestilación, el uso de solventes y la destilación por arrastre de vapor, los cuales serán descritos en los párrafos siguientes.

2.4.1.1 Destilación con agua (hidrodestilación)

El principio de la destilación en agua es llevar a estado de ebullición una suspensión acuosa de un material vegetal aromático, de tal manera que los vapores generados puedan ser condensados y colectados. El aceite, que es inmisible en agua, se separa posteriormente (Bandoni, 2000). En la destilación con agua el material vegetal siempre debe encontrarse en contacto con el agua, si el calentamiento del equipo es con fuego directo, el agua presente en la cámara extractora debe ser suficiente y permanente para llevar a cabo toda la destilación a fin de evitar el sobrecalentamiento y carbonización del material vegetal, dado que este hecho provoca la formación de olores desagradables en el producto final; el material vegetal debe ser mantenido en constante agitación a fin de evitar aglomeraciones o sedimentación del mismo en el fondo del recipiente, lo cual puede provocar su degradación térmica (Bandoni, 2000).

El tiempo total de destilación es función de los componentes presentes en el aceite esencial. Si el aceite contiene compuestos de alto punto de ebullición, el tiempo de destilación deberá ser mayor, los aceites esenciales obtenidos mediante destilación en agua normalmente presentan notas más fuertes y un color más oscuro con respecto a los producidos por otros métodos (Bandoni, 2000).

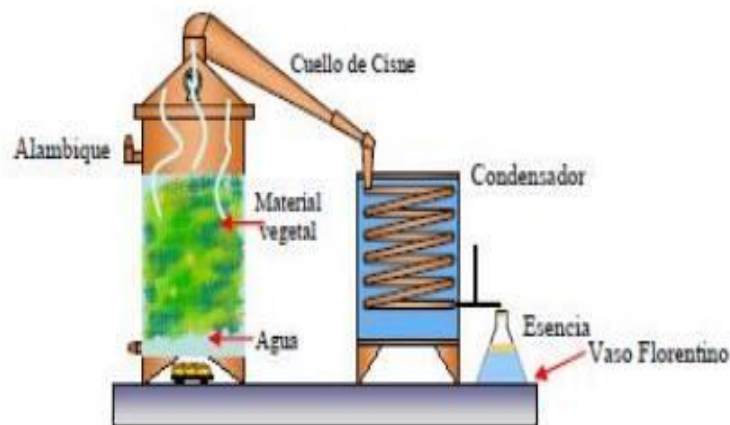


Figura 6. Método de Hidroddestilación..

2.4.1.2 Uso de solventes

En este método, la muestra seca y molida se pone en contacto con solventes tales como alcohol, cloroformo, etc. Estos solventes solubilizan la esencia pero también solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas y ceras, obteniéndose al final una esencia impura. En ocasiones es común utilizar agua caliente a la temperatura de ebullición para obtener extractos que no sean de naturaleza oleosa (solubles en agua) a manera de infusión.

Se utiliza a escala de laboratorio pues a nivel industrial resulta costoso por el valor comercial de los solventes, pues se obtienen esencias impurificadas con otras sustancias, y además por el riesgo de explosión e incendio característicos de muchos solventes orgánicos volátiles (Bandoni, 2000).

2.4.1.3 Destilación por arrastre con vapor de agua.

En la destilación por arrastre con vapor de agua, la muestra vegetal generalmente fresca y cortada en trozos pequeños, se coloca en un recipiente cerrado y sometida a una corriente de vapor de agua, la esencia así arrastrada es posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa. Esta técnica es muy utilizada especialmente para esencias muy volátiles, por ejemplo las utilizadas para perfumería. Se utiliza a nivel industrial debido a su alto rendimiento, a la pureza del aceite obtenido y porque no requiere tecnología sofisticada (Albarracín

y Gallo, 2003). La destilación por arrastre con vapor que se emplea para extraer la mayoría de los aceites esenciales es una destilación de mezcla de dos líquidos inmiscibles y consiste en una vaporización a temperaturas inferiores a las de ebullición de cada uno de los componentes volátiles por efecto de una corriente directa de vapor de agua, el cual ejerce la doble función de calentar la mezcla hasta su punto de ebullición y adicionar tensión de vapor a la de los componentes volátiles del aceite esencial; los vapores que salen de la cámara extractora se enfrían en un condensador donde regresan a la fase líquida, los dos productos inmiscibles, agua y aceite finalmente se separan en un dispositivo decantador o vaso florentino (Bandoni, 2000).



Figura 7. Destilación por arrastre de vapor.

2.4.2 Métodos alternativos

2.4.2.1 Ultrasonidos en la hidrodestilación

La aplicación del ultrasonido facilita la liberación del aceite esencial de las paredes celulares de la materia vegetal sometida al proceso extractivo, se caracteriza por transmitir cantidades sustanciales de energía por la acción de vibraciones de las partículas presentes en el medio de extracción, la aplicación del ultrasonido depende de la composición del fenómeno acústico que se produce dentro del tipo del material al cual es aplicado, además que las presiones acústicas causan fenómenos de cavitación aunado a microcorrientes en los líquidos,

calentamiento y fatiga en los sólidos. Así mismo hay que tomar en cuenta que la aceleración ultrasonora es responsable de la inestabilidad que ocurre en la interfase líquido-líquido y líquido-gas (Albarracín y Gallo, 2003).

2.4.2.2 Extracción por microondas

Consiste en calentar el agua contenida en el material vegetal, que a su vez está inmerso en un disolvente “transparente” a las microondas como puede ser el CCl₄ hexano o el tolueno. Al aumentar la temperatura del medio, se rompen las estructuras celulares que contienen a la esencia por efecto de su presión de vapor.

La esencia es así liberada y disuelta en el disolvente presente en el medio. La principal ventaja de esta técnica es su velocidad, pues pueden lograrse extracciones en minutos, cuando comparativamente una técnica tradicional como la hidrodestilación necesita varias horas (Bandoni, 2000). La implementación del sistema de microondas a escala industrial, si bien es factible tecnológicamente, implica una fuerte inversión económica. Además, debe tenerse en cuenta que, como en cualquier cambio de las tecnologías tradicionales, los productos obtenidos suelen diferir en calidad de los normalmente ofrecidos en el mercado internacional y pueden por lo tanto significar un problema para competir con el producto comercialmente consagrado (Bandoni, 2000).

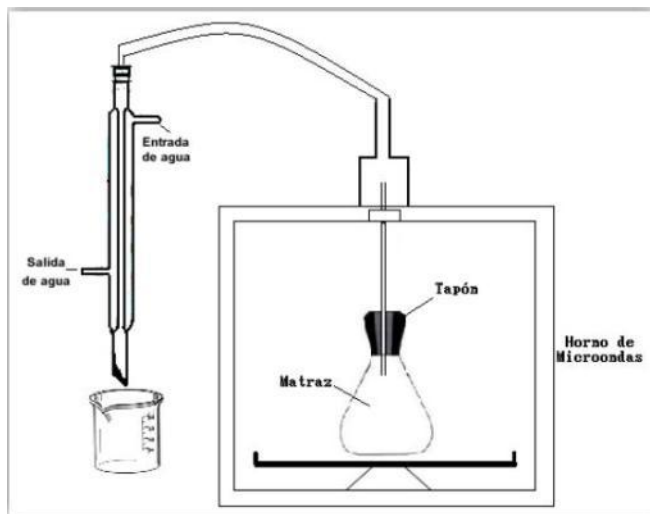


Figura 8. Diseño preliminar de la Hidroddestilación asistida por microondas.

2.4.2.3 Extracción con fluidos en estado supercrítico

El principio básico de esta técnica se basa en el cambio de propiedades de transporte y de solubilidad que presenta un solvente en este estado. Para el caso de dióxido de carbono como fluido en estado supercrítico dos factores compiten en la influencia de la solubilidad de los solutos. Al incrementar la temperatura se incrementa la presión de vapor del soluto y por lo tanto su solubilidad; sin embargo simultáneamente a un incremento en la temperatura se disminuye la densidad del CO_2 con lo cual tiende a decrecer la solubilidad del soluto; conforme la presión se incrementa por encima del punto crítico del dióxido de carbono (7.38 MPa), la densidad del fluido se vuelve menos dependiente de la temperatura y la presión de vapor del soluto se vuelve dominante, de manera que la solubilidad del soluto se incrementa con la temperatura (Bandoni, 2000). El método de extracción con fluidos supercríticos, es de desarrollo más reciente.

El material vegetal cortado en trozos pequeños, licuado o molido, se empaca en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un fluido en estado supercrítico (por ejemplo CO_2), las esencias son así solubilizadas y arrastradas y el fluido supercrítico, que actúa como solvente extractor, se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente

finalmente se obtiene una esencia cuyo grado de pureza depende de las condiciones de extracción. Aunque presenta varias ventajas como alto rendimiento, es ecológicamente compatible, el solvente se elimina fácilmente e inclusive se puede reciclar y las bajas temperaturas utilizadas para la extracción no cambian químicamente los componentes de la esencia, sin embargo el equipo requerido es relativamente costoso ya que se necesitan bombas de alta presión y sistemas de extracción también resistentes a las altas presiones (Bandoni, 2000).

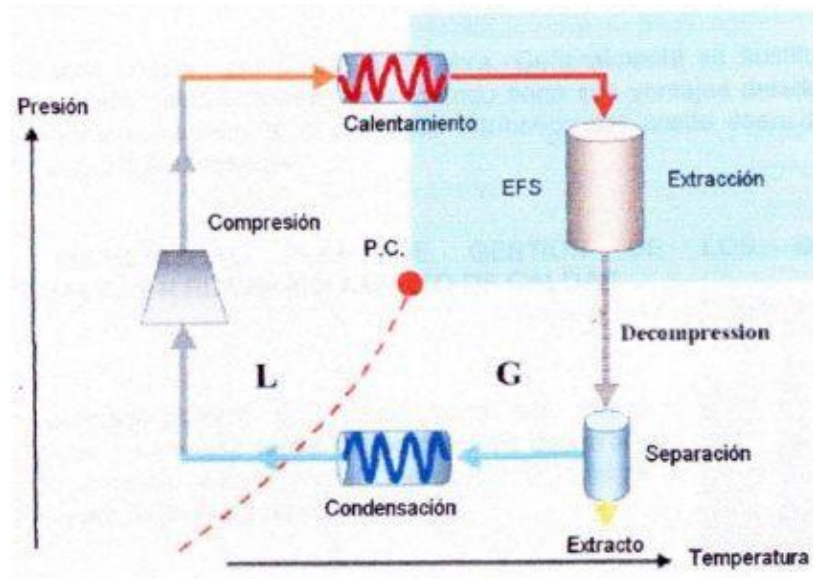


Figura 9. Principio de la Extracción por Fluidos Supercríticos

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización del experimento

El presente trabajo se realizó en los laboratorios del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos pertenecientes a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, sede Saltillo Coahuila, ubicada en Buenavista y en los laboratorios del Centro de Investigación para los Recursos Naturales (CIRENA), ubicado en la comunidad de Salaices, López, Chihuahua, se desarrolló el estudio de identificación de componentes activos por cromatografía de gases acoplado a masas.

3.2 Materiales y equipo de laboratorio

3.2.1 Material Biológico

Los residuos vegetales de orégano *Lippia graveolens*, fueron proporcionadas por el Departamento de Investigación de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila. Para su análisis previamente, se tamizaron utilizando dos mallas metálicas No. 8 (2.38mm de abertura) y No. 40 (0.420mm de abertura), con la finalidad de tener dos tamaños de partícula de los residuos denominándolos M1 (+ malla 8) y M2 (+ malla 40).

3.2.2 Materiales de Laboratorio

A continuación se enlista en el cuadro 6, los materiales empleados, en el cuadro 7 se observan los reactivos implementados para las pruebas y en el cuadro 8 se indica el equipo.

Cuadro 6. Materiales empleados en los diferentes análisis realizados al orégano (*Lippia graveolens*)

✓ Cajas Petri	✓ Puntillas para micropipeta
✓ Matraz Erlenmeyer	✓ Tubos de ensaye
✓ Matraz de Aforación	✓ Gradilla
✓ Microespátula	✓ Vasos de precipitado
✓ Micropipeta	✓ Aluminio
✓ Pipeta	✓ Agitador
✓ Probeta	✓ Asa bacteriológica
✓ Pinza	✓ Lámparas de alcohol
✓ Papel filtro	✓ Celdillas para espectrofotómetro
✓ Parafilm	✓ Porta objetos
	✓ Cubre objetos

Cuadro 7. Reactivos utilizados en los diferentes análisis realizados a los residuos de orégano (*Lippia graveolens*).

✓ Hexano	✓ Cloroformo
✓ Etanol	✓ Ácido gálico
✓ Agar McConkey	✓ Metanol
✓ Agar PDA	✓ Folín
✓ Agar CZAPEK	✓ Na ₂ CO ₃ (Carbonato de Sodio)
✓ Tween 80	✓ Catequina
✓ AlCl ₃ (Cloruro de Aluminio)	✓ NaNO ₂ (Nitrito de Sodio)
✓ NaOH (Hidróxido de Sodio)	

Cuadro 8. Equipo utilizado en los análisis del orégano (*Lippia graveolens*) describiendo marca y modelo de cada uno.

Equipo	Marca	Modelo
Parrilla	Thermo Scientific	Cimaret
Microscopio	Konus	BM-100FL
Autoclave	Yamato	SK100C
Campana de flujo laminar vertical	Scorpion	A80000
Incubadora orbital	Prendo	INO650V-7
Balanza analítica	Ohaus	Adventurer
Refrigerador	Mabe	RM88U04
Espectrofotómetro	Termo Electron Corporation	Genesys 10UV
Vortex	Benchmark	BPR
Refractómetro	Pocket	A728299
Colorímetro	Konica Minolta	CR400
Incubador Shaker	Inova 44	I44R

3.3 Metodología experimental

3.3.1 Etapa I. Obtención de los extractos.

3.3.1.1 Agua.

En esta investigación, se utilizó el método convencional correspondiente al uso de solventes: agua, etanol y hexano, las especificaciones del método se describen a continuación:

Se colocaron en un matraz erlenmeyer 15gr del residuo en 200ml de agua, se calentó a punto de ebullición durante 10min y finalmente se filtró el extracto.

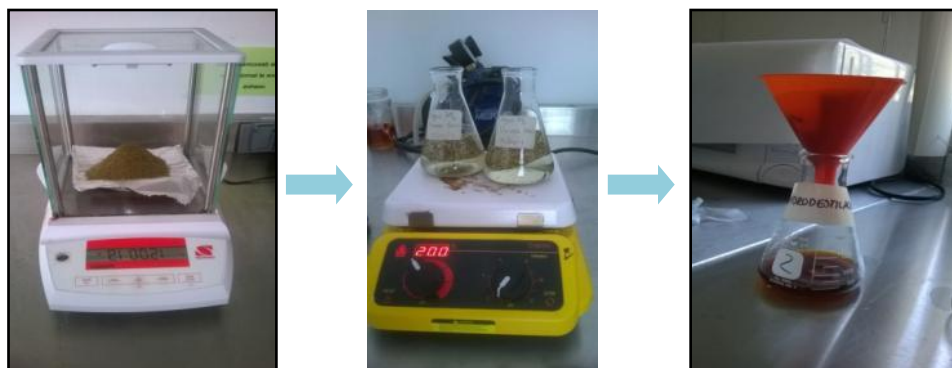


Figura 10. Diagrama de bloques para obtener los extractos utilizando agua como solvente.

3.3.1.2 Solventes orgánicos (etanol y hexano)

Para los solventes etanol y hexano, en un matraz de aforación con capacidad de 250ml, se colocaron 15gr del residuo de orégano en 200ml de solvente, las muestras se agitaron a temperatura de 31°C y 150 rpm durante 24 horas en el incubador Shaker marca Inova-44, modelo I44R , finalmente los extractos obtenidos fueron filtrados y guardados en frascos de vidrio para su posterior caracterización.



Figura 11. Diagrama de bloques de la extracción con solventes.

3.3.2 Etapa II. Caracterización Físicoquímica de los Extractos

3.3.2.1 Cromatografía en fase gaseosa acoplada a espectrometría de masas

Fundamento de la Técnica:

Durante las dos últimas décadas se ha demostrado que uno de los métodos más eficientes para el estudio de la composición de los aceites esenciales es la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG-EM). Es un método muy adecuado para la identificación debido a que los componentes del aceite son compuestos volátiles y de bajo peso molecular. La esencia se inyecta directamente en el cromatógrafo, sin ningún tratamiento previo, lo cual elimina posibles modificaciones en la composición de la muestra o en la estructura de sus constituyentes debidas a pretratamiento. No se eliminan las alteraciones debidas a la temperatura de análisis, que puede afectar componentes termosensibles. En el cromatógrafo, los componentes de la esencia se separan, tras lo cual penetran en el espectrómetro de masas, que permite registrar el correspondiente espectro de cada una de las sustancias separadas. Los constituyentes del aceite esencial se identifican gracias a los diferentes patrones de fragmentación que se observan en sus espectros de masas (Albarracín y Gallo, 2003).

La CG-EM permite realizar en una sola operación, para una muestra del orden de 1 μ L, un análisis cualitativo junto con una indicación de las proporciones en las que se encuentran componentes. Cuando se dispone de sustancia patrón, la calibración del equipo permite un análisis cuantitativo exacto de la muestra (Albarracín y Gallo, 2003). Es posible determinar índices de retención en el CG-EM, pero estos pueden no ser comparables con los bibliográficos, que generalmente se han obtenido con cromatógrafos no acoplados a un espectrómetro (Albarracín y Gallo, 2003).

El objetivo de esta técnica es determinar existen los compuestos mayoritarios en las fracciones del aceite esencial

Condiciones de operación:

De cada uno de los extractos obtenidos con los diferentes solventes y cada tamaño de partícula de residuos vegetal, se-realizó una inyección automática de 1 μ L

de las muestras presentes en los viales en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Clarus 500 acoplado con un detector de masas. El cromatógrafo se operó usando helio como gas acarreador con un flujo de 50 ml/min, inyección con división de flujo (split 5:1) a 250°C del inyector, utilizando una columna capilar ELITE-1. Se usó el siguiente programa de temperatura de horno: 55°C iniciales seguidos de una rampa de 3°C/min hasta llegar a 95°C, seguidos de una rampa de 1°C/min hasta llegar a 150°C.

El espectrómetro de masas se operó a una velocidad de flujo de 50 ml/min, con un voltaje de ionización de 70eV, con una temperatura de la interface de 250°C, en modo SCAN y en un intervalo de masas de 35-600m/Z.

Se revisó la pureza de cada uno de los picos de los cromatogramas y la comparación de espectros de masas de los compuestos en la muestra con los espectros de la Biblioteca National Institute of Standards and Technology (NIST02), que hace el software Data Analysis de modo automático.



Figura 12.Equipo de cromatografía de gases.

3.3.2.2 Colorimetría

Fundamento de la Técnica:

Se conoce como colorimetría a la técnica instrumental la cual tiene como objetivo determinar la absorción de la luz visible de una determinada muestra. Debido a la percepción subjetiva de la tonalidad de colores, en 1931 la CIE (Commission Internationale de l'Eclairage), definió los estándares que permiten definir el color, basándose en la percepción del ojo humano, gracias a un estímulo triple. La CIE desarrolló el sistema colorímetro X y Y, el cual se representa por dos

ejes "x Y", y su luminosidad, eje Y; el cual evolucionaría en 1976 al modelo colorimétrico $L^*a^*b^*$, también llamado CIELab, en el que indican 3 valores.

- L: el eje L^* o de luminosidad va de 0 (negro) a 100 (blanco), expresado como porcentaje.
- a^* y b^* representan los dos ejes de coordenadas, a^* es la variación entre rojizo-verdoso y b^* entre amarillento-azulado. Los colores van de -120 al +120. (Figura 13).

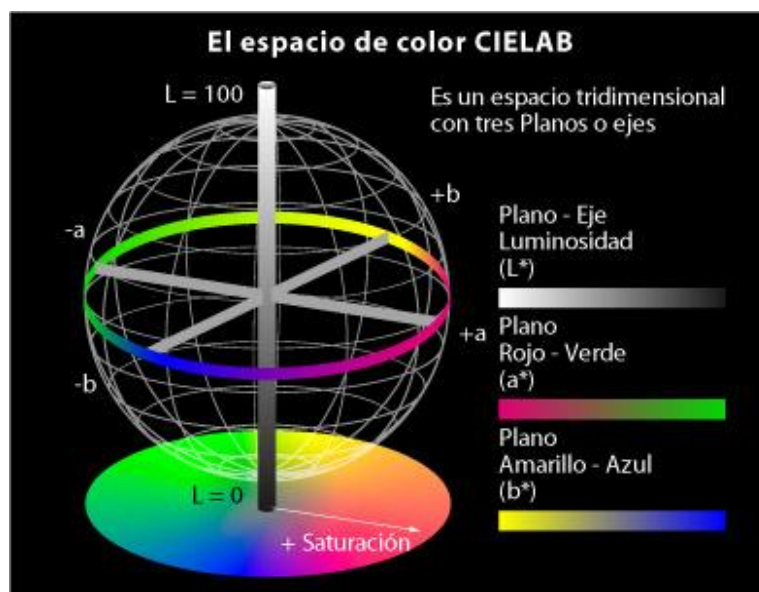


Figura 13. Modelo CIELab para determinar coordenadas a^*b^* .

Condiciones de operación:

La prueba de colorimetría fue aplicada a los extractos de orégano (*Lippia Graveolens*) utilizando un fotocolorímetro marca Konica-Minolta modelo CR400, obteniéndose los valores $L^*a^*b^*$. Se colocó 30ml de cada extracto en una caja Petri, se realizaron 5 mediciones de color en diferentes puntos de la muestra, con 3 repeticiones cada una. Los resultados condensados se muestran en el (anexo 1).



Figura 14. Equipo utilizado en la medición de colorimetría

3.3.2.3 Refractometría (índice de refracción)

Fundamento de la Técnica:

El índice de refracción puede determinarse mediante un refractómetro electrónico y suele medirse también a 20°C o de lo contrario se realiza una corrección por diferencia de temperatura. Este parámetro tiene interés para detectar adulteraciones y sus principales ventajas son la rapidez y sencillez con que pueden obtenerse.

Su principio se basa en un rayo de luz que pasa oblicuamente desde un medio hacia otro de diferente densidad, cambia su dirección cuando traspasa la superficie. Este cambio en la dirección se denomina refracción. Cuando el segundo medio es más denso que el primero, el rayo se aproxima a la perpendicular trazada sobre la superficie divisoria en el punto de incidencia. La causa fundamental de este cambio en la dirección se debe al cambio en la velocidad de la luz que se hace más lenta cuanto más denso sea el medio por el que pasa el haz. La luz amarilla de la lámpara de sodio disminuye su velocidad desde 3×10^{10} cm/s en el vacío hasta $2,25 \times 10^{10}$ cm/s en el agua.

El ángulo formado entre el rayo en el primer medio y la perpendicular se llama *ángulo de incidencia*, i , mientras que el correspondiente ángulo en el segundo medio se denomina *ángulo de refracción*, r . El *índice de refracción*, n , es la razón entre las velocidades de la luz en ambos medios. (Analítica, 2010)

Los componentes de los aceites esenciales con frecuencia son ópticamente activos, siendo un isómero óptico el que predomina. por esta razón, la determinación del poder rotatorio puede ser de gran utilidad para la detección de adulteraciones o falsificaciones.

Condiciones de operación

Para la determinación del índice de refracción se utilizó un refractómetro marca Pocket, modelo A728299 en donde se colocó una pequeña muestra del extracto de orégano sobre el prisma de medición y se observó el resultado.



Figura 15. Refractómetro utilizado para medir el índice de refracción.

3.3.3 Etapa III. Determinación de la actividad antimicrobiana

3.3.3.1 Viabilización e identificación de cepas microbianas

Se trabajó con una cepa bacteriana: *Escherichia coli* como representante Gram negativo, y con dos diferentes tipos de hongos *Aspergillus niger* y *Penicillium*.

La cepa de *Escherichia Coli* fue proporcionada por el laboratorio de microbiología de la Universidad Autónoma de Coahuila. El medio de cultivo en el cual se preparó de acuerdo a la composición mostrada en el (cuadro 9) esterilizándose en tubos de ensaye.

Cuadro 9. Composición en g/100ml de medio

Peptona de caseína	1.7
Peptona de carne	0.3
Cloruro sódico	0.5
Fosfato monopotásico	0.25
Dextrosa	0.25

Se viabilizó la cepa en el caldo e incubó durante 72 horas a 37°C. Posteriormente se sembró el microorganismo en cajas Petri conteniendo agar McConkey se incubó durante 72 horas. Una vez que aparecieron las colonias características, mediante la técnica de tinción de Gram, se determinó la morfología microscópica.

Aspergillus niger: se viabilizó en cajas petri con Agar Dextrosa Papa; sembrándose por estría, se incubó durante 36 hrs a temperatura de 37°C. Por último se preparó tween 80 al 0.1% para hacer una resuspensión de esporas y posteriormente un análisis morfológico, observándose en el microscopio óptico a 100x.

Penicillium: Al igual se viabilizó en cajas petri con Agar CZAPEK; sembrándose por estría, se incubó durante 36 hrs a temperatura de 37°C. Por último se preparó tween 80 al 0.1% para hacer una resuspensión de esporas y posteriormente un análisis morfológico, observándose en el microscopio óptico a 100x para corroborar la obtención de un cultivo puro.

3.3.3.2 Valoración de la eficiencia antimicrobiana

Se determinó cualitativamente la eficiencia antimicrobiana de cada extracto mediante la técnica de antibiograma utilizando la metodología normalizada de Kirby Bauer la cual consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico

difunde al agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición (Maye Bernal, 1984).

En este trabajo se realizaron antibiogramas, para determinar la capacidad antimicrobiana de los extractos, se prepararon y esterilizaron los sensidiscos (círculos de papel filtro, 6mm de diámetro) se sumergieron en los diferentes extractos, para después colocarlos dentro de las cajas que contenían los inóculos. Se colocó 0.1ml de inóculo en las cajas, procurando que se impregnaran totalmente los sensidiscos, se incubaron durante 72 horas a una temperatura de 37°C para su crecimiento.

3.3.4 Etapa IV. Determinación de la actividad antioxidante de los extractos

3.3.4.1 Espectrofotometría

En el presente trabajo la concentración de fenoles y flavonoides totales en extractos de orégano fue determinada mediante espectrofotometría. Los resultados se reportaron en (mg/ml) equivalentes a curvas usando como (base):

- ✓ Fenoles : solución de ácido gálico (ANEXO # 3).
- ✓ Flavonoides: solución estándar de catequina. (ANEXO # 4).

Debido a la alta concentración de las muestras a analizar obtenidas con Etanol y Agua, se realizó una dilución 1:10 en agua destilada, para facilitar las lecturas en el espectrofotómetro.

Fenoles

Para la determinación de fenoles se tomó 1ml de muestra diluida a la que se le agregaron 0.500ml de reactivo Folin y 0.250ml de Na_2CO_3 , cada tubo se homogenizó en vortex, para posteriormente leer absorbancia en espectrofotómetro a

760nm. La cuantificación de flavonoides se efectuó mediante la curva de calibración realizada previamente.(ANEXO # 3)

Flavonoides

Se tomó 1ml de muestra diluida y se agregaron 0.75g de NaNO_2 , 0.150ml de AlCl_3 , 0.500ml de NaOH 1M y 0.025 ml de agua destilada, para ser homogeneizadas en vortex, después de agregar cada reactivo. La lectura en el espectrofotómetro se realizó a 510 nm, para calcular la concentración de fenoles mediante la curva de calibración realizada anteriormente (ANEXO #4).



Figura 16. Espectrofotómetro implementado para cuantificación de fenoles y flavonoides.

CAPÍTULO IV

4.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.1 Etapa I. Extracción de los extractos

En la obtención de los extractos mediante el método convencional, uso de solventes orgánicos (etanol y hexano), se logró observar mayor solubilidad en la muestra donde se utilizó etanol, ya que al momento de vertir las muestras para el filtrado se obtenía un extracto más viscoso, tal como lo reporta Cárdenas Garzón (2012) en su investigación donde dice que el aceite es totalmente soluble en etanol de 90 y 96% , para este proceso se utilizó alcohol absoluto. Los aceites con mayor cantidad de compuestos oxigenados son solubles en etanol de menor concentración, mientras que los aceites con monoterpenos y sesquiterpenos son solubles en alcoholes de mayor concentración tal como lo describe Peredo-Luna y Col; (2009)., se logra extraer otras sustancias como grasas y ceras, obteniéndose al final una esencia impura.



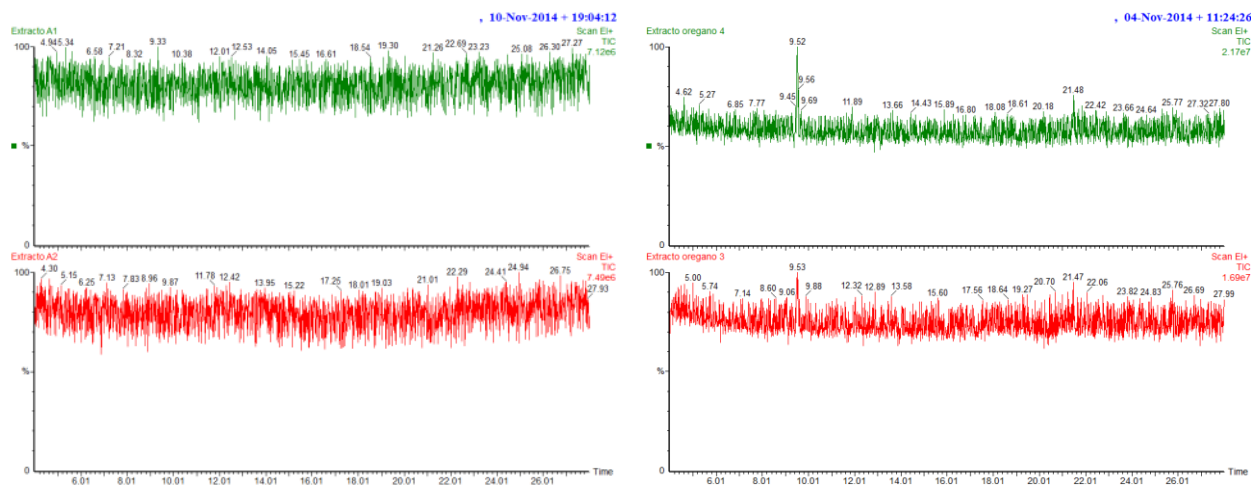
Figura 17. Extractos de orégano (*Lippia Graveolens*)

Los métodos convencionales se utilizan a escala de laboratorio, pues a nivel industrial resulta costoso por el alto valor comercial de los solventes y porque se obtienen esencias mezcladas con otras sustancias.

4.1.2 Etapa II. Características físico-química

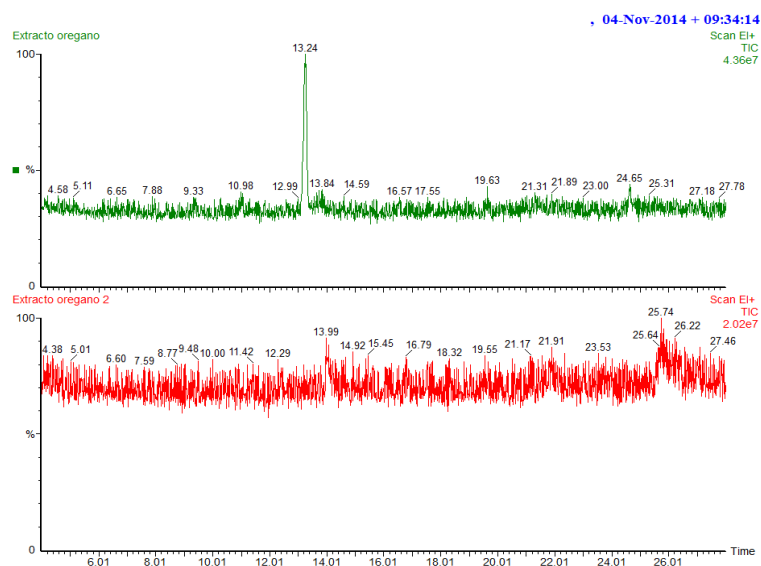
4.1.2.1 Cromatografía en fase gaseosa acoplada a espectrometría de masas

Los extractos analizados mediante cromatografía de gases fueron evaluados cualitativamente a partir de la comparación de espectros de la Biblioteca National Institute of Standards and Technology (NIST02) que se llevó a cabo con el software Data Analysis de manera automática. De acuerdo a los cromatogramas mostrados en la figura 19, no se observa la presencia de compuestos mayoritarios en extractos acuosos; en tanto que para los etanólicos, se obtiene una señal de mayor intensidad a los 9.5min, correspondiendo ésta al p-cimeno. Para los extractos obtenidos con hexano se observa una señal a los 13.24 y 13.99 min para tamaños de partícula de residuo M₁ y M₂, respectivamente, la cual corresponde al γ -terpineno (Tabla 3).



a) M₁ superior, M₂ inferior

b) M₁ inferior, M₂ superior



c) M₁ superior, M₂ inferior

Figura 18. Cromatogramas de extractos de orégano a partir diferentes tamaños de partícula (M₁ y M₂) de residuos vegetales obtenidos por diferentes métodos: a) Hidrodestilación, b) Etanol; c) Hexano.

Cuadro 10. Tiempos de retención de los compuestos identificados en los extractos mediante GC

	Hd (min)	Et (min)	Hx (min)
M₁	-	9.53	13.24
M₂	-	9.52	13.99

Se ha reportado que la composición química de aceites esenciales provenientes de las hojas del orégano del género *Lippia graveolens*, está conformada por compuestos tales como el timol, carvacrol, p-cimeno, fenandreno, naringenina, pinocembrina, entre otros (Pascual y col; 2001); sin embargo es posible encontrar la presencia de diferentes compuestos incluso en dos lotes de un mismo aceite esencial, y más aún en extractos provenientes de diferentes partes de la planta. Estas diferencias se deben a la época de cosecha, el método de extracción, condiciones de almacenamiento; así como a las condiciones geobotánicas, tipo de suelo, época de recolección y edad de la planta (Stashenko, E. y col. 2010), (Albado, E.; Saez, G. y Grabiell, S. 2001), entre otros.

4.1.2.2 Colorimetría

Se encontraron diferencias significativas entre los extractos para los valores de luminosidad (L) al igual que para las variables a^* y b^* (cuadro 8), el extracto hexánico presentó el más alto valor de luminosidad por lo cual resulta ser el extracto de color más claro, como se muestra en la (figura 19) con esto difiero con la investigación de Peredo-Luna y Col; (2009) donde reporta que el extracto hexánico es de color más oscuro que el etanólico ya que éste solvente llega arrastrar algunos pigmentos de la planta. Con una mayor saturación de color se encuentra el extracto etanólico amarillo verdoso. Mientras para el extracto de hidrodestilación (agua) se presenta mayor saturación de color rojizo (ver figura 19).

Cuadro 11. Valore medios y desviación estándar de las coordenadas de $L^*a^*b^*$ de los extractos de orégano.

Extractos	L	a	B
Etanol M1	78.41±0.89	-11.04±1.12	41.90±6.22
Etanol M2	78.09±1.53	-12.54±0.28	47.24±3.51
Hexano M1	85.60±1.00	-3.05±1.40	9.23±3.58
Hexano M2	86.35±0.56	-0.30±0.38	1.85±0.67
Agua M1	66.45±9.98	1.87±5.99	44.10±7.41
Agua M2	80.31±1.08	-3.29±0.26	23.32±5.77

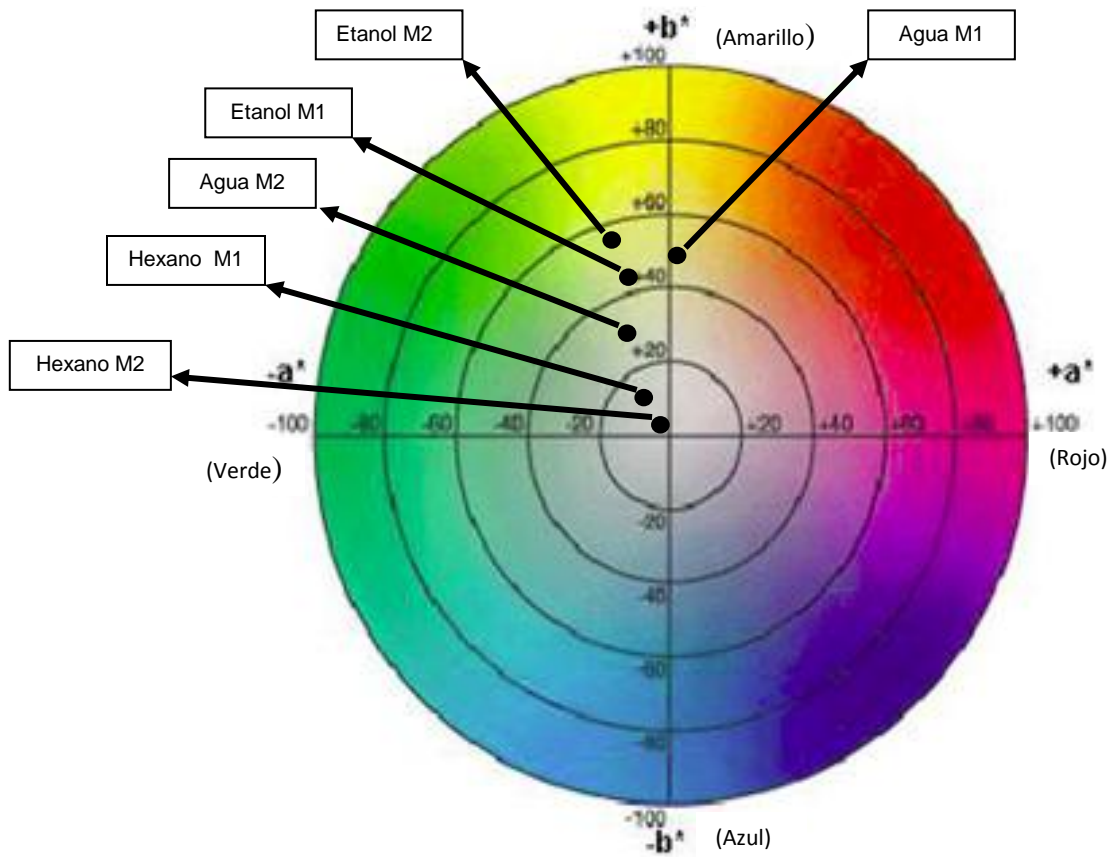


Figura 19. Identificación de los extractos en el diagrama del sistema de notación $L^*a^*b^*$.

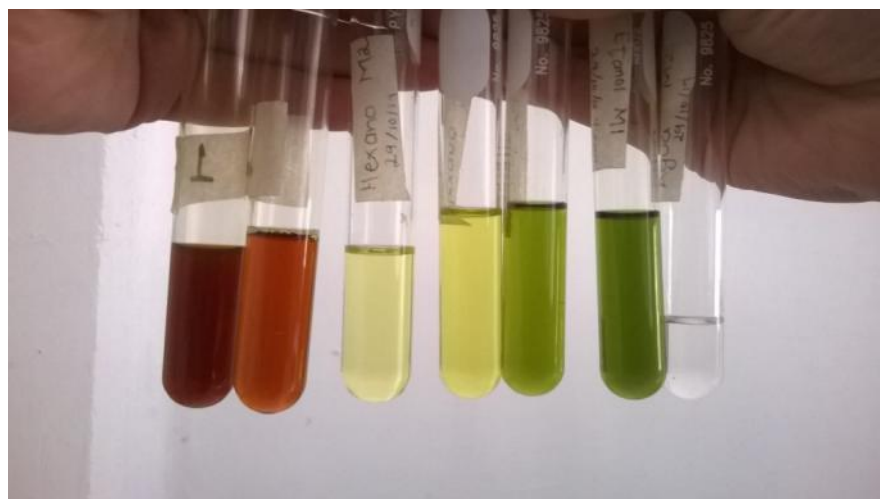


Figura 20. Colorimetría de extractos de orégano *Lippia graveolens*.

De acuerdo a lo reportado por autores como (Flores y Col; 2004), (Cameroni, 2013) y (Ortega,2013) nos dicen que el color característico del aceite de orégano es color amarillo, cabe mencionar que en esta investigación se trabajó con residuos de orégano los cuales eran una mezcla de hojas, tallos y semillas por tal motivo no se logró extraer un aceite puro como tal.

Los extractos obtenidos son de diferentes colores debido al uso de los solventes orgánicos utilizados los cuales poseen diferente afinidad y polaridad con los aceites.

4.1.2.3 Refractometría (índice de refracción)

El objetivo principal de esta prueba es identificar el grado de pureza del aceite esencial, este valor es estandarizado para cada aceite esencial. Al realizar la lectura se obtuvieron los siguientes valores:

Extractos	Índice de refracción
Hexano M1	30.38
Hexano M2	30.38
Etanol M1	21.4
Etanol M2	21.6
Agua M1	1.7
Agua M2	0.42

El índice obtenido con los extractos hexánicos y etanólicos presentan un valor muy elevado de acuerdo a las investigaciones de (Ríos Vázquez, 2008), (Guerra A. y Col; 2008) y (Alaniz-Gutierrez y col; 2000) el índice de refracción del aceite de orégano es de 1.47 -1.50 , sin embargo los extractos obtenidos mediante hidrodestilación están por debajo del valor establecido. Esto se atribuye a que los solventes orgánicos solubilizan la esencia pero también solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas y ceras, obteniéndose al final una esencia impura.(Bandoni 2000).

Para la determinación del índice de refracción se tomaron 2 muestras de cada extracto, cada muestra se realizaron 3 repeticiones. Los resultados condensados se muestran en el anexo 2.

4.1.3 Etapa III. Determinación de la actividad antimicrobiana

4.1.3.1 Viabilización e identificación de cepas bacterianas

La morfología macroscópica de la bacteria *Escherichia coli* colonias convexas, de color rojo fucsia, con bordes lisos y continuos crecimiento característico del microorganismo en el agar MacConkey debido a la fermentación de la lactosa, (Elmer Koneman, 2008) como se muestra en la figura 21.

Microscópicamente tras la tinción de Gram, se observaron bacilos cortos Gram negativos, como se representan en la (Figura 21). Las características morfológicas que se han descrito coinciden con las reportadas por Ramis Vergés, (1998), Ramírez Santos y col; (2005).

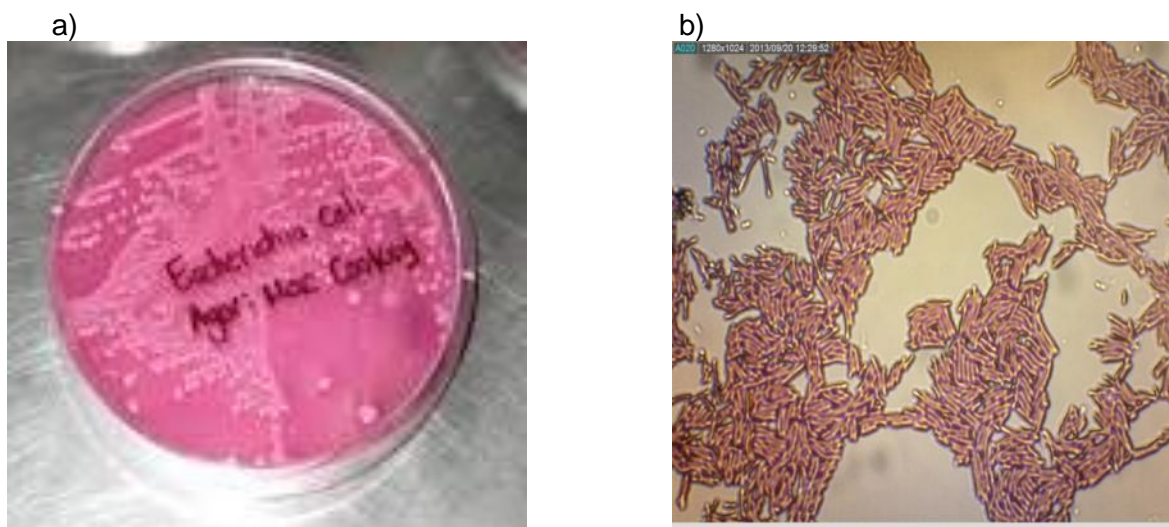


Figura 21. a) Morfología macroscópica y b) microscópica de *Escherichia coli*.

4.1.3.2 *Aspergillus niger*

El color de las colonias al principio es blanco a amarillo, luego es negro, la textura de las colonias es granular y algodonosa (ver figura 22). El reverso de la colonia es de color incoloro o crema. Las características morfológicas que se han descrito coinciden con las reportadas por (Guevara y col; 2007).

La observación microscópica revela esporulación profusa, conidios pequeños, esporulados verdes pardos esta características coincide con lo reportado por (Torrinegra G. 2011).

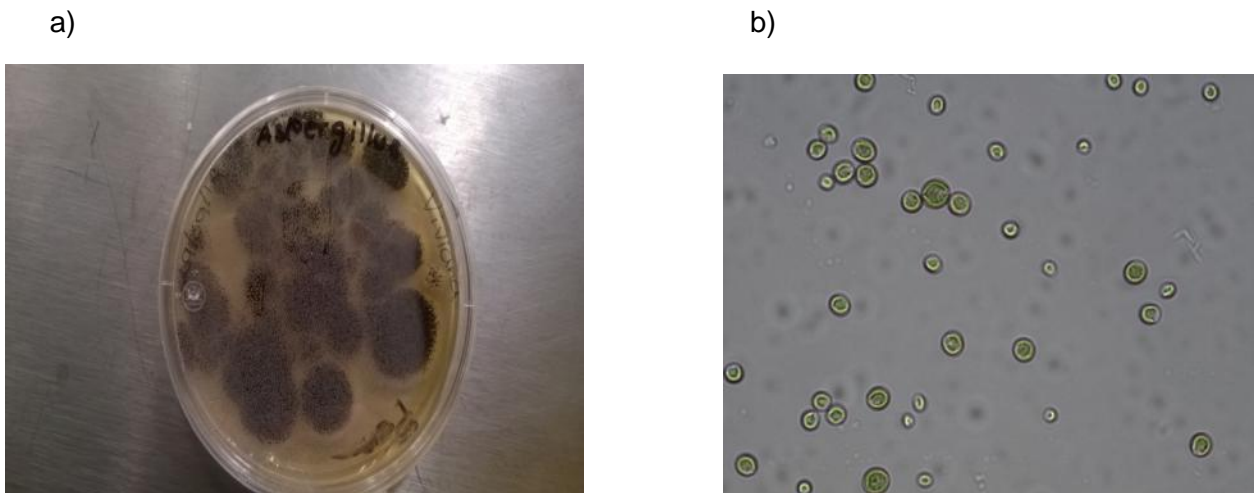


Figura 22. a) Morfología macroscópica y b) microscópica de *Aspergillus niger*.

4.1.3.3 *Penicillium*

Las morfologías presentadas en las colonias de las especies de *penicillium* macroscópicamente son granulares de bordes lisos por lo general con varias tonalidades de verde aunque a veces se encuentran variantes amarillas y amarillo castañas como se observan en la (figura 23). Microscópicamente, los conidios son esféricos de tamaño regular y con una tinción uniforme, lo que representa un tipo de conidiación acrópeta en la cual se forma conidios idénticos en secuencia de los extremos de los conidios ya formados estas características tanto macroscópicas como microscópicas que se han descrito coinciden con las reportadas (Koneman E. y col; 2008)



Figura 23. Morfología macroscópica de *Penicillium*

4.1.3.4 Valoración de la eficiencia antimicrobiana

En el análisis del efecto antimicrobiano para microorganismos tales como *A. niger* y *Penicillium*, el resultado fue negativo, ya que en presencia de cualquiera de los extractos en estudio no mostraron halo de inhibición a los hongos. Mientras que para la bacteria *E. coli*, el extracto que presentó un efecto antimicrobiano fue el obtenido con etanol, ya que los sensibilizadores impregnados con los otros dos extractos mostraron una proliferación microbiana homogénea y abundante, tal como se observa en la figura 24.

El diámetro del halo de inhibición en extractos etanólicos fue mayor para el proveniente de partículas M_2 respecto a las de M_1 como se muestra en la figura 24.



a) Agua



b) Etanol



c) Hexano

Figura 24. Antibiogramas de los extractos obtenidos por el uso de diferentes solventes aplicados a diferentes tamaños de partícula (M_1 y M_2) de residuos vegetales de orégano.

Cuadro 12. Diámetros (mm) de halos de inhibición de los extractos de residuos vegetales de orégano.

	<i>E. Coli</i>	<i>A. Nigger</i>	<i>Penicillium</i>
M₁-Hd	0	0	0
M₂-Hd	0	0	0
M₁-Et	1	0	0
M₂-Et	5	0	0
M₁-Hx	0	0	0
M₂-Hx	0	0	0

La inhibición bacteriana de los extractos etanólicos para la *E. coli*. concuerdan con lo reportado por Esteban Mendez y col; (2011). quienes evaluaron la actividad

antimicrobiana de extractos etanólicos provenientes de planta seca de orégano (*Lippia graveolens*) en bacterias tales como la *E. coli.*, *S. typhimurium* y *S. aureus* observando inhibición al crecimientos de las cepas.

4.1.4 Etapa IV. Determinación de la actividad antioxidante de los extractos.

4.1.4.1 Espectrofotometría

Durante la caracterización del efecto antioxidante se determinó que este es dependiente del tamaño de partícula del residuo, encontrándose mayor contenido de fenoles y flavonoides en M₁ (2.38mm), respecto a M₂ (0.42mm). Por otro lado la naturaleza del solvente determina el contenido de antioxidantes que es capaz de extraer de los residuos, siendo el etanol más eficiente para los fenoles, en tanto que el agua lo fue para los flavonoides, tal como se muestra en la tabla 5. Lo anterior puede deberse a la naturaleza polar tanto del etanol como del agua, lo cual muestra mayor afinidad electrónica con las sustancias antioxidantes de interés.

Cuadro 13. Concentración (mg/ml) de sustancias antioxidantes en los extractos de residuos vegetales de orégano.

	Fenoles	Flavonoides
M _{1-Hd}	0.041	0.129
M _{2-Hd}	0.033	0.111
M _{1-Et}	0.065	0.105
M _{2-Et}	0.056	0.100
M _{1-Hx}	0.005	0.009
M _{2-Hx}	0.002	0.002

CAPITULO V

CONCLUSIONES

La elección del método de extracción depende de la finalidad para la que son requeridos los extractos o aceites esenciales y si existe un interés particular por la concentración y/o recuperación de algún compuesto especial.

Los métodos convencionales para la extracción de aceites esenciales son sencillos pero suelen tener rendimientos bajos. Los métodos alternativos ofrecen ventajas reduciendo los tiempos de extracción y el consumo de energía.

El tamaño de partícula influye en el contenido de sustancias antioxidantes, ya que M_1 presenta mayor concentración de fenoles y de flavonoides, en cuanto al efecto del solvente, la cantidad de fenoles es mayor en Et, mientras que flavonoides en Hd. En relación al efecto antimicrobiano, el extracto que presenta potencial es Et, el cual contiene principalmente p-cimeno. En el extracto Hx el compuesto mayoritario presente fue el γ -terpineno, ambos compuestos son precursores de timol y carvacrol los cuales por sí mismo no poseen actividad antimicrobiana.

Conocer características fisicoquímicas como índice de rancidez, densidad e índice de refracción permite caracterizar un aceite esencial y así mismo poder asegurar que el mismo cumple con los parámetros de calidad.

Se ha demostrado que el orégano contiene sustancias antioxidantes, por lo que no sólo es benéfico para la salud humana, sino que además puede sustituir los aditivos sintéticos de los alimentos.

Los resultados de los experimentos con orégano confirman el potencial de esta planta y motivan su mejor aprovechamiento.

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFÍA

AGRO DIARIO. 2005. El negocio del orégano en Argentina.

<http://www.agrodiario.com.ar/Notas/Varios2005-01-11b.htm>

Disponible el 14/02/2005 a las 21:06 hrs.

ALANÍS-Gutiérrez L., Castro-Franco R., Gómez Lorence F.2000. Contribución al estudio de la calidad de aceite esencial en orégano (*lippia graveolens h.b.k.*). Revista Chapingo; Serie Zonas Aridas. Vol. 1 (1): 13-19.

ALBARRACÍN Montoya G. C., Gallo Palma S. G. 2003. *Comparación de dos métodos de extracción de aceite esencial utilizando piper aduncum (cordoncillo) procedente de la zona cafetera* (Trabajo de grado para optar el título de “Ingeniero Químico”). Universidad Nacional de Colombia sede Manizales Ingeniería química.

ALBADO, E.; Saez, G. y Grabiell, S. 2001. “Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano)” *Revista Medica Herediana*, 12(1), 17-19.

ALIGIANNIS N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB, . 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49: 4168-4170.

ÁLVAREZ, C. A. 1999. Determinación y cuantificación de la capacidad antimicrobiana y antioxidante de las fracciones polares del orégano (*Origanum vulgare L.*). Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Chihuahua.

ANALÍTICA III. Refractometría y Polarimetría, 2010.

<http://clasesusanita.blogspot.mx/2010/01/refractometria-y-polarimetria.html>

Disponible el 17/11/15 a las 11:00 hrs.

ANGULO C., A., Flores J., D.A., Tejada C., J. y Campos V., R. (2004) Orégano: oro verde del semidesierto, pp 60-65. La riqueza de los bosques mexicanos más allá de la madera: experiencias de comunidades rurales. SEMARNAT. México

- ARCILA-LOZANO C.C.**, Loarca-Piña G., Lecona-Urbe S. y González de Mejía E. (2004). "El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes" Archivos Latinoamericanos de Nutrición, Artículo número 14.
- ÁVILA-SOSA** Sánchez, R.. 2001. Estudio químico y biológico de las fracciones de oregano (*Origanum vulgare* L.). Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Chihuahua.
- AZUMA K**, Ippoushi K, Ito H, Higashio H, Terao J. 1999. Evaluation of antioxidative activity of vegetable extracts in linoleic acid emulsion and phospholipid bilayers, J. Sci. Food and Agric. 1999; 79: 2010-2016.
- BANDONI, A.** 2000. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Editorial Universidad Nacional de la Plata. Argentina.
- BURT, S. 2004.** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – A review. International Journal of Food Microbiology. 94 (3), 223-253.
- CAMERONI G.** 2013. Ficha Técnica de Orégano "*Origanum vulgare*". Subsecretaría de Agregado de Valor y Nuevas Tecnologías. Dirección de Agroalimentos. Area de Sectores Alimentarios Argentinos.
- CÁRDENAS** Garzón, 2012. Extracción de aceites esenciales de la flor de jazmín (*Jasminum officinale*) para la elaboración de una formulación de interés agroindustrial. Tesis para título de Ingeniera Agroindustrial. Universidad de San Buenaventura facultad de Ingeniería programa de Ingeniería Agroindustrial. Santiago de Cali.
- CAZARES** Alonso P. N. , Villavicencio G. E., Verde Star J. , Pecina Q.V. e Humberto Almeyda L. 2010. Caracterización molecular y producción de aceites esenciales de diferentes genotipos de orégano (*Lippia* sp.) Revista mexicana de ciencias forestales vol.1 no.1 México
- CODIFICACIÓN CIE/ L*a*b** <http://es.kioskea.net/contents/711-codificación> cie-l-ab;16Noviembre.2014.
- CONABIO** (Comisión Nacional de Biodiversidad). 2005. Orégano Mexicano: Oro Vegetal. <http://www.conabio.gob.mx/biodiversitas.htm>.

CONAFOR, Comisión Nacional Forestal (2005). “Orégano mexicano, oro verde del desierto”. México Forestal, (revista electrónica de la CONAFOR).

http://www.mexicoforestal.gob.mx/nuestros_arboles.php?id=29

CONAFOR (2011). Paquete Tecnológico para la producción de orégano *Lippia*, Spp.

En línea: <http://www.conafor.gob.mx/biblioteca/fichas-de-informacion-comercial-productosforestales.pdf>

CONTRERAS FLORES V. H. 2010. “Implementación a nivel laboratorio de una unidad de extracción de volátiles por radiación de microondas”. Instituto tecnológico de Durango. Victoria de Durango, Dgo, México.

CORRAL-Torrecillas, L.; González-Güereca, M.C. y Vicencio de la Rosa, G. 2011 “Producción de compost a partir de residuos generados en el proceso de aprovechamiento del orégano”, *El orégano mexicano: estado actual del conocimiento*. Durango, México. Edit. La casa editorial de Durango. Pag. 153-160.

ELMER Koneman, W, 2008. Diagnóstico microbiológico. Argentina: Panamericana.

ESTEBAN Méndez, M.; Quintos Escalante, M.; Camacho Luis, A. y Avitia Dominguez, C. I. 2011 “Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de orégano y wareke” *El Orégano Mexicano: estado actual del conocimiento*. CIIDIR-IPN. Casa editorial de Durango. Pag.103-107.

FLORES Solano A. L. Hernández Escobar A. L., Valladares Reyes M. G., 2004. Determinación de la actividad antifúngica de aceites esenciales extraídos de *lippia graveolens* (orégano), *rosmarinus officinalis* (romero) y *eucalyptus globulus* (eucalipto) en *microsporum canis trichophyton rubrum* y *epidermophyton floccosum*.

Tesis de Licenciatura en Química y Farmacia. Universidad de el Salvador Facultad de Química y Farmacia. San Salvador, El Salvador, Centro América.

FLORES, G. G. J. 1991. Selección de una propuesta de manejo para orégano, en la zona norte de Jalisco. INIFAP-CIFAP-JALISCO.

GARCÍA, G. y Ortega, S. 2007 *Aprovechamiento de orégano silvestre en la región de Nazas Durango*. INIFAP. Campo experimental la Laguna. XII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Hortícolas

- GARCÍA P. E,** Castro Álvarez F; Gutiérrez-Uribe J. A. y García Lara S. 2012. Revisión de la producción, composición fitoquímica y propiedades nutraceuticas del orégano mexicano. Revista mexicana de ciencias agrícolas. vol.3 no.2
- GARCÍA V. N. A.** 2012. Aprovechamiento de orégano silvestre (*Lippia* spp.), en la comunidad de Tesila, El Fuerte, Sinaloa. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Indígena de México. Institución intercultural del estado de Sinaloa.
- GONZÁLEZ** Villa A.A.,2004. Obtención de aceites esenciales y extractos etanolicos de plantas del amazonas. Línea de Profundización: Tecnología en Alimentos. Universidad nacional de Colombia sede Manizales departamento de ingeniería química.
- GRANADOS-SÁNCHEZ** D.; Martínez-Salvador M; . López-Ríos G. F ; Borja-De la Rosa A; . Rodríguez-Yam G. 2013. Ecología, aprovechamiento y comercialización del orégano (*Lippia graveolens* H. B. K.) en Mapimí, Durango. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente. vol. 19, núm. 2, mayo-agosto, 2013, pp. 305-321 Universidad Autónoma Chapingo Chapingo, México
- GUERRA A.,** Carlos M. , Galán O., Jorge A. , Méndez A., Jonh J. y Murillo A., E. 2008. Evaluación del efecto del extracto de orégano (*Oreganum vulgare*) sobre algunos parámetros productivos de cerdos destetos. Revista Tumbaga (2008), 3, 16-29
- GUEVARA** Robles, Miriam; Urcia Ausejo, Flor y Casquero Cavero, J. 2007. Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas. Medicina y Laboratorio, Volumen 16, Números 7-8, 2010 373
- HUERTA, C.** (1997). Orégano Mexicano: oro vegetal. CONABIO. Biodiversitas 15:8-13.
- ISMÁN,** M. 2000. Plant Pierson, M.D. 1990. Effect of sodium nitrite and origanum oil on growth and toxin production of *Clostridium* essential oils for pests and disease management. Crop Protection. 19: 603-608.
- KLAUER GARCÍA** F.D. 2009.Manual Técnico de cultivo ecológico de orégano (*origanum* sp L.) El Taller Asociación de Promoción y Desarrollo.2009. 56 Pág.

- KONEMAN E. W.**, y col; 2008. Diagnóstico microbiológico. Buenos aires, Bogotá, Caracas, Madrid, México y Porto Alegres. 6ta Edición. Editorial Medica Panamericana. Pp. 1349.
- MARTÍNEZ D. M.**, 1990. Detección y evaluación del orégano *Lippia berlandieri Schauer* para su aprovechamiento en el Norte de Jalisco. Folleto Técnico No. 2. INIFAP.SAGAR. Guadalajara, Jalisco. 16 p
- MARTÍNEZ, D. M.** (1994). El manejo técnico del orégano, *Lippia berlandieri Schauer*, en Jalisco. Guadalajara, Jalisco, México: Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos
- MATA-GONZÁLEZ, R. & R. Meléndez-González.** 2005. Growth characteristics of mexican oregano (*Lippia berlandieri Schauer*) under salt stress. *Southwestern Naturalist* 50:1-6
- MAYE BERNAL, R.** 1984 “El antibiograma de discos, normalización de técnica de Kirby-Bauer” *Revista biomédica*, 4, 112-121
- MORALES A. G.** 2005. Aplicación del aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri shauer*) en la conservación de carnes roja de res. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Departamento de Nutrición y alimentos.
- MOURE A,** Cruz J M, Franco D, Domínguez J M, Sineiro J, Domínguez H, Núñez M J and Parajó J C. 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem.* 2001; 72(2): 145-171.
- MUÑOZ CENTENO, L. M.** (2002). Plantas medicinales españolas *Origanum Vulgare L* (Laminaceae) (OREGANO). *Acta Botanica Malacita.* 27:273- 280
- ORTEGA Nieblas M.M.**, 2013. Importancia del aceite esencial y la producción de orégano *lippia palmeri* Watson en el estado de Sonora. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud.* Volúmen XV (1): 57-64.
- PASCUAL, M.E.;** Slowing, K.; Carretero, E.; Sánchez, M. y Villar, A. 2001 “*Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: A review” *J. Ethnopharmacol* 76, 201-214.
- PRATES, H. T.;** Santos, J. P.; Waquil, J. M.; Fabris, D.; Oliveira, A. D.; Foster, J. E. 1998. Insecticidal activity of monoterpenes against *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Tribolium castaneum* (Herbs). *J. Stored Prod. Res.* 34(4):243 – 249.

- PEREDO-Luna** H.A. Palou E., García A. López Malo. 2009. Aceites esenciales: Métodos de extracción. Temas selectos de ingeniería de alimentos 3-1,24-32. Universidad de las Américas Puebla, San Andrés Cholula, Pue., México.
- RAMÍREZ** Santos, J., Contreras Ferrat, G y Carmen, G.E., 2005. La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*. Revista latinoamericana de Microbiología, 95-101.
- RAMIS** Vergés, M., 1998. *Escherichia Coli* patógeno intestinal. En microorganismos de alimentos. (págs. 147-164), España: ACRIBIA
- RÍOS** Vásquez E. 2008. Evaluación del aceite esencial y estudio de conservación en frío del *cymbopogon citratus* cultivado en la región del Quindío. Revista de Investigación de la Universidad del Quindío (20): 24-28. Armenia - Colombia
- ROLANDO**, A. 2007. *Aceite esencial de orégano: tratamiento por digestión anaeróbica de los residuos generados en su obtención*. Universidad Nacional de Luján. Buenos Aires, Argentina.
- SÁNCHEZ**, O., Medellín, R., Aldama, A., Goettsch, B., Soberón, J. y Tambutil, M. (2007). Métodos de Evaluación de Riesgo de Extinción de las especies silvestres en México (MER). Instituto Nacional de Ecología. México. 173 pág.
- SEMARNAT**. 2001. *Evaluación del riesgo de extinción de Lippia graveolens*. De acuerdo al numeral 5.7 de la NOM-059-SEMARNAT 2001.
- SEMARNAT**. 2009 *Aprovechamiento Forestal*. SEMARNAT, Delegación Durango. (Disponible en: http://www.semarnat.gob.mx/estados/durango/temas/paginas/aprov_forestal.aspx). Revisado en 23 de abril del 2011)
- SILVA**, V. R. Y **DUNFOR** T. N. 2003. Bioactive components of mexican oregano oil as effected by moisture and plant growth phase. Oklahoma State University, Stillwater, Ok. American Oil Chemistry society (AOCS) Kansas, City, Mo.
- SILVA**, V.R. 2003. El oréno (*Lippia berlandieri shauer*) como Alternativa de Producción agrícola Sustentable para las zonas Áridas y Semiáridas de México. Folleto para productores. Cirena. Salaiques, Chihuahua.
- SILVA-VÁZQUEZ**, R., Gastélum-Franco, M.G., Torres-Muñoz, J.V. y Nevárez-Moorillón, G.V. (2008). Fitoquímicos Sobresalientes del Semidesierto Mexicano:

de la planta a los químicos naturales y a la biotecnología. ISBN 978-968-6628-760. pp-579

SILVA, R. 2005. El orégano (*Lippia graveolens* Shauer.) una alternativa agroindustrial para las zonas áridas y semiáridas de México. Memorias Segunda Reunión Nacional de Orégano. CIRENA. Salta, Chihuahua

SIVROPOULOU A, Papanikolaou E, Nikolaou C, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M., 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 1996; 44: 1202-1205.

STASHENKO, E. y col. 2010 “*Lippia organoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis” *J. Sep. Sci.*, 33, 93–103

TORRENEGRA G. 2011. contribución fotográfica al estudio de microhongos filamentosos del Páramo de Guasca. Grupo de Investigación en Biotransformación y Fitoquímica de la Pontificia Universidad Javeriana. (GIBUJ-GIF)

VILLAVICENCIO E., Martínez O, Cano A, y Berlanga C. 2007“Orégano, recurso con alto potencial”. *Revista Ciencia y Desarrollo*, Septiembre 2007, Vol. 33, no. 211, p. 60-66

ZHISHEN J, mengcjheng t, jianming w. 1999. the determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *food chem* 64: 555-559.

CAPITULO VII

ANEXOS 1

Análisis de colorimetría de extractos de orégano

Solvente	muestra	L	a*	b*
Hexano	M1	86.35	-3.74	9.90
		86.18	-2.28	6.75
		85.75	-0.57	3.27
		84.98	-3.76	11.08
		83.90	-3.51	12.88
		86.48	-4.43	11.51
	M2	86.14	-0.53	2.02
		87.04	-0.18	1.86
		86.65	0.31	0.85
		86.80	-0.81	2.92
		85.60	-0.36	1.71
		85.89	-0.23	1.72
Etanol	M1	86.14	-0.53	2.02
		87.04	-0.18	1.86
		86.65	0.31	0.85
		86.80	-0.81	2.92
		85.60	-0.36	1.71
		85.89	-0.23	1.72
	M2	79.93	-12.44	43.23
		77.01	-12.47	48.50
		76.80	-12.45	49.66
		76.62	-12.92	51.25

		78.27	-12.81	48.19
		79.90	-12.16	42.64
Agua	M1	57.36	7.49	51.37
		58.87	6.33	50.87
		55.96	8.12	50.25
		74.28	-3.48	38.20
		75.96	-3.83	37.47
		76.26	-3.41	36.41
		79.02	-3.08	30.79
	M2	81.32	-3.07	25.47
		80.70	-3.41	27.94
		81.68	-3.04	15.23
		79.74	-3.52	19.90
		79.39	-3.62	20.61

ANEXO 2

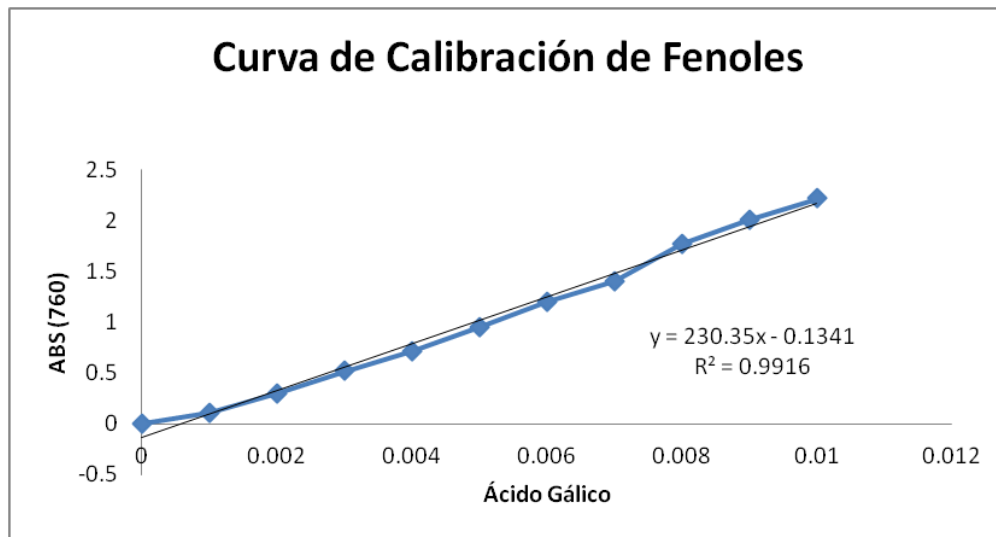
Análisis de la determinación del índice de refracción.

Solvente	Muestra	R1	R2
Hexano	M1	30.1	30.5
		30.6	30.7
		30.5	30.8
	M2	29.7	30.6
		30.4	30.7
		30.3	30.6
Etanol	M1	21.3	21.2
		21.5	21.8
		21.9	21.9
	M2	21.2	21.2
		21.4	21.4
		21.3	21.9
Agua	M1	2.2	1
		2.4	1.1
		2.4	1.1

		0.6	0.2
	M2	0.5	0.3
		0.5	0.4

ANEXO 3

Curva de calibración para cuantificación de los fenoles, con ecuación lineal.



ANEXO 4

Curva de Calibración para cuantificación de flavonoides, con ecuación lineal.

