

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE TRES ACEITES ESENCIALES
EN EMULSIONES TIPO MARGARINA DEGRADADAS POR RADIACIÓN
ULTRAVIOLETA**

GEOVANNA TAFURT GARCÍA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2003**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE TRES ACEITES ESENCIALES
EN EMULSIONES TIPO MARGARINA DEGRADADAS POR RADIACIÓN
ULTRAVIOLETA**

GEOVANNA TAFURT GARCÍA

Trabajo de grado presentado como requisito
parcial para optar al título de Magíster en
Química

Directora: Dra. Elena E. Stashenko,
Química, Ph.D

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2003**

DEDICATORIA

A Dios por entregármelo todo

A mis padres Eliécer y Nelcy, por su incondicionalidad y por depositar toda su fe en mí. A mis hermanos Elkin, Elmer y Eder, por apoyarme en cada momento.

A Belquis por enseñarme que siempre hay una puerta abierta, pero sobre todo por enseñarme la humildad.

A todos los que hoy están, y a todos los que ya se fueron, por enseñarme a vivir

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elena, por todas sus enseñanzas y por creer en todos nosotros, porque su esperanza nos ha contagiado y nos ha hecho pensar en que podemos entregarle cosas valiosas a las personas que nos rodean, sólo si luchamos!, sólo si creemos!

Al Dr. Jairo René, por las todas las sugerencias aportadas y el apoyo brindado.

A mis profesores por permitirme entender algo más de lo oculto.

A todos mis amigos y compañeros. A todos los integrantes del Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander, quienes se convirtieron en mi segunda familia; por todos los favores recibidos.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	16
2. ESTADO DEL ARTE	20
2.1 DETERIORO OXIDATIVO	20
2.1.1 Autoxidación	20
2.1.2 Fotoxidación	27
2.1.3 Oxidación enzimática	29
2.2 ANTIOXIDANTES	30
2.3 MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	33
2.4 ACEITES ESENCIALES	37
2.4.1 Aceites esenciales de <i>Origanum vulgare</i> L., <i>Coriandrum sativum</i> L. y <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	37
3. PARTE EXPERIMENTAL	45
3.1 REACTIVOS Y MATERIALES	45
3.2 PREPARACIÓN DE MUESTRAS	47
3.3 DETERIORO OXIDATIVO	47
3.4 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO	49
3.4.1 Análisis de ácidos grasos	49
3.4.2 Análisis del hexanal	50

3.4.3	Análisis de aceites esenciales	51
3.5	ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	52
3.6	ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE DOS POSIBLES ANTIOXIDANTES	54
3.7	EVALUACIÓN DE TRES FRACCIONES DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO	54
4.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	55
4.1	CARACTERIZACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES	55
4.2	CONDICIONES DEL DETERIORO OXIDATIVO	57
4.3	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	62
4.4	INTERACCIÓN ENTRE DOS ANTIOXIDANTES	70
4.5	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE FRACCIONES DEL AE DE ORÉGANO	71
5.	CONCLUSIONES	73
6.	RECOMENDACIONES	74
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
8.	BIBLIOGRAFÍA	103

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Composición de los aceites esenciales de orégano, romero y cilantro de diferentes orígenes geográficos.	39
Tabla 2. Actividad antimicrobial del aceite esencial de orégano.	42
Tabla 3. Actividad antioxidante de los aceites esenciales de orégano, romero y cilantro.	43
Tabla 4. Lista de reactivos y solventes usados en el presente estudio.	45
Tabla 5. Margarinas y aceites vegetales empleados en este proyecto.	46
Tabla 6. Cantidades utilizadas en g/kg para evaluar la interacción entre el aceite esencial de orégano, la vitamina E y el AC en la margarina "Sabrina".	54
Tabla 7. Composición de los aceites esenciales obtenidos por HD.	55
Tabla 8. Longitudes de onda emitidas por las lámparas fluorescentes en el fotoreactor "home-made", usado en el presente estudio.	58
Tabla 9. Actividad antioxidante de los aceites esenciales de cilantro, romero y orégano, la vitamina E y el ácido ascórbico en la margarina "sabrina" durante el deterioro oxidativo acelerado con radiación UVA-VIS.	63
Tabla 10. Actividad antioxidante del aceite esencial de orégano, determinada por medio de dos métodos analíticos en la margarina "Sabrina".	68
Tabla 11. Actividad antioxidante del AE de orégano determinada en los sistemas MS y ESDS a través de la cuantificación del hexanal.	70
Tabla 12. Actividades antioxidantes de las mezclas de antioxidantes en la margarina "Sabrina" determinadas por medio de la cuantificación del hexanal.	70

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Formación de hidroperóxidos durante la oxidación del ácido linoleico.	22
Figura 2. Escisión β de los monohidroperóxidos.	23
Figura 3. Escisión β del monohidroperóxido del ácido linoleico.	24
Figura 4. Formación del hexanal en medios acuosos [$R_1 = CH_3(CH_2)_4$, $R_2 = (CH_2)_7COOH$].	25
Figura 5. Formación de un hidroperoxi-epidioxido a partir del ácido α -linolénico.	26
Figura 6. . Transiciones electrónicas de una molécula o sensibilizador.	28
Figura 7. Producción de hidroperóxidos a través del mecanismo de fotosensibilización.	29
Figura 8. Peroxidación lipídica catalizada por enzimas.	30
Figura 9. Estructura del α -tocoferol y sus respectivas reacciones con radicales alquílicos.	32
Figura 10. Atrapamiento de radicales peroxilo por carotenoides.	33
Figura 11. Transesterificación de lípidos catalizada por ácidos.	34
Figura 12. Transesterificación de lípidos catalizada por bases.	35
Figura 13. Derivatización de aldehídos con pentafluorofenilhidracina.	36
Figura 14. Estructura de algunos componentes comunes en aceites esenciales.	38

- Figura 15. A. Fotografía (vista general) del reactor UV "home-made". B vista superior (esquema) del sistema para fotoxidación de las emulsiones de margarina y de SDS. 48
- Figura 16. Perfiles cromatográficos obtenidos por HRGC- μ ECD, de productos secundarios finales de margarina "Sabrina" irradiada: a. con papel aluminio. A. sin papel aluminio. los aldehídos fueron derivados con PFPH. 59
- Figura 17. Generación del hexanal en margarina "Sabrina" irradiada durante varias horas. 60
- Figura 18. Degradación del ácido linoleico en margarina "Sabrina" irradiada durante varias horas. 61
- Figura 19. Estructura del ácido ascórbico y su reacción con el radical tocoferoxílo. 64
- Figura 20. Actividades antioxidantes *in vitro* de los AE's y el ácido ascórbico con respecto a la actividad antioxidante de la vitamina E.

$$k = A\%_{\text{sustancia}} / AA\%_{\text{vitamina E}}$$
 65
- Figura 21. Actividad antioxidante del AE de orégano evaluada por medio de la cuantificación del hexanal y del ácido linoleico.
 Donde, $k = AA\%_{\text{sustancia}} / AA\%_{\text{vitamina E}}$. 67
- Figura 22. Actividad antioxidante del aceite esencial de orégano determinada en las emulsiones de margarina "Sabrina" y de dodecil sulfato de sodio. 69
- Figura 23. Actividad antioxidante de las fracciones del aceite esencial de orégano, obtenidas por cromatografía en columna. 72

ABREVIATURAS

AA	Actividad antioxidante
ABTS	2,2'-Azinobis-(3-etilbenzotiazolina-ácido sulfónico)
AC ⁻	Ácido ascórbico (anión radical)
ACH ⁻	Ácido ascórbico
AE	Aceite esencial
AE's	Aceites esenciales
AHMT	4-Amino-3-hidracina-5-mercapto-1,2,4-triazol
AP	Antioxidantes preventivos
ARC	Antioxidantes de ruptura de cadena
AS	Antioxidantes secundarios
B	Benceno
BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Butilhidroxitolueno
d _f	Espesor de la fase estacionaria (μm)
D.I.	Diámetro interno de la columna cromatográfica (mm)
DMSH	Dansilhidracina- o- (2,3,4,5,6-pentafluorbencil)-hidroxilamina
DNPH	Dinitrofenilhidracina
DO	Deterioro oxidativo
DPPH [·]	2,2-Difenil-1-picrilhidracilo
E	Éter
ESDS	Emulsión con dodecilsulfato de sodio
ESR	Resonancia electrónica de espín
FAME's	Ésteres metílicos de ácidos grasos
FPD	Detector fotométrico de llama
HBT	2-Hidracinobenzotiazol
HD	Hidrodestilación
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución

HRGC- μ ECD	Cromatografía de gases de alta resolución con un detector de microcaptura de electrones
HRGC-FID	Cromatografía de gases de alta resolución con un detector de ionización en llama
IR	Infrarrojo
L	Longitud de la columna cromatográfica (m)
MS	Margarina "Sabrina"
MSD-SIM	Detector selectivo de masas, operando en el modo iones seleccionados
NADP	Dinucleótido de fosfato de adenina nicotinamida
NADPH	Dinucleótido de fosfato de adenina nicotinamida reducido
NMH	n-metil-hidracina - 1-metil-1-(2,4-dinitrofenil)-hidracina
NPD	Detector de nitrógeno-fósforo
P	Pentano
PFPH	Pentafluorofenilhidracina
PG	Propilgalato
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SPME	Microextracción en fase sólida
TBHQ	<i>ter</i> -Butil-hidroxi-quinona
TIC	Corriente iónica total
TO $\cdot$	Radical tocoferoxilo
TOH	Tocoferoles
TOH-3	Tocotrienoles
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A, 320-380 nm
UVB	Ultravioleta B, 290-320 nm
UVC	Ultravioleta C, 190-290 nm
UV-VIS	Ultravioleta-visible

LISTA DE ANEXOS

- ANEXO 1. Cromatogramas (TIC) de los aceites esenciales de *coriander sativum* L., *origanum vulgare* L. y *rosmarinus officinalis* L. obtenidos por HRGC-MSD.
- ANEXO 2. Ácidos grasos presentes en mezcla patrón, aceite vegetal "Gourmet" y margarina "Sabrina".
- ANEXO 3. Ácidos grasos presentes en algunas margarinas y aceites vegetales comerciales.
- ANEXO 4. Degradación de las emulsiones de margarina "Sabrina" y de dodecil sulfato de sodio, con y sin protección de la radiación UVA-visible.
- ANEXO 5. Cromatogramas de las fracciones obtenidas a partir del aceite esencial de orégano, por cromatografía en columna.

TITULO

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE TRES ACEITES ESENCIALES EN EMULSIONES TIPO MARGARINA DEGRADADAS POR RADIACIÓN ULTRAVIOLETA*

AUTOR

GEOVANNA TAFURT GARCIA**

PALABRAS CLAVES

Antioxidantes, aceites esenciales, emulsiones, radiación ultravioleta.

RESUMEN

El deterioro oxidativo que ocurre en membranas celulares y alimentos, entre otros sistemas, puede prevenirse con antioxidantes de origen natural o sintético. Los investigadores han realizado múltiples estudios con el objeto de encontrar sustancias naturales antioxidantes que puedan remplazar a las sustancias de origen sintético utilizadas comercialmente; en estos estudios han encontrado que varios extractos y aceites esenciales de origen vegetal poseen actividad antioxidante apreciable. Para evaluar la capacidad que posee una sustancia en inhibir o prevenir el deterioro oxidativo acelerado, se debe diseñar un sistema modelo constituido por un sustrato, un medio de deterioro oxidativo y una técnica analítica de medición.

En este trabajo se evaluaron las actividades antioxidantes de los aceites esenciales de *Origanum vulgare* L., *Rosmarinus officinalis* L. y *Coriandrum sativum* L. en emulsiones sometidas al deterioro oxidativo causado por la exposición a radiación UVA-VIS. Para la evaluación de la actividad antioxidante se cuantificó el ácido linoleico como su éster metílico, por medio de la cromatografía de gases de alta resolución acoplada a un detector de ionización en llama y además se cuantificó el hexanal como su pentafluorofenilhidrazona, por cromatografía de gases de alta resolución acoplada a un microdetector de captura de electrones.

Entre los aceites esenciales estudiados, el de orégano presentó mayor protección, seguido por los de cilantro y romero. El aceite esencial de orégano exhibió actividad antioxidante mayor a la de la vitamina E, para concentraciones de 1, 10 y 20 g/kg. Se determinó que la acción antioxidante de los aceites esenciales de orégano y cilantro aumentaba proporcionalmente con su concentración en la margarina. Al evaluar la actividad antioxidante de las mezclas de la vitamina E con el aceite esencial de orégano y el ácido ascórbico con el mismo aceite, no se encontraron efectos sinérgicos, ni aditivo.

* Tesis

** Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Elena E. Stashenko

TITLE

EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THREE ESSENTIAL OILS AT THE EMULSIONS OF MARGARINE DEGRADED BY ULTRAVIOLET RADIATION*

AUTHOR

GEOVANNA TAFUR GARCIA**

KEY WORDS

Antioxidants, essential oils, emulsions, ultraviolet radiation.

ABSTRACT

The oxidative deterioration that happens in the cell membranes and in foods, among other systems, it can be prevented by the use of antioxidants of natural or synthetical origen. The researchers have performed multiple studies with the objective of finding out natural antioxidants substances that can replace the substances of synthetical origen used in the market; in these studies it has been found that several extracts and essential oils of vegetal origen have a valuable antioxidant activity. To evaluate the capacity of a substance to restrain or prevent the fast oxidative deteriorate, a model system made of a sustrate, a medium of oxidative deteriore and a measurement process have to be design.

In this paperwork the antioxidant activities of the essential oils of *Origanum vulgare L.*, *Rosmarinus Officinalis L.* and *Coriandrum sativum L.* were evaluated in emulsions submitted to oxidative deterioration caused by the exposure to radiation UVA-VIS. For the evaluation of the antioxidant activity the linoleic acid such as methilic esther was measured, thanks to the gas chromatography of high resolution joint to a flame ionization detector, moreover hexanal was measured such as pentafluorophenylhydrazine, thanks to the gas chromatography of high resolution joint to a electrons capture detector.

Among the studied essential oils, the one from *Origanum* presented a higher protection, followed by the one of *Coriandrum* and *Rosmarinus*. The essential oil of the *Origanum* presented an antioxidant activity higher than the vitamine E, to 1, 10 and 20 g/kg concentrations. It was determine that the antioxidant action of the esential oils of the *Origanum* and *Coriandrum* increased in the same proportion as its margarine concentration. To evaluate the antioxidant activities of the vitamine E mixtures with the essential oils of *Origanum* and ascorbic acid with the same oil, no sinergic effects nor aditives were found.

* Thesis

** Science Faculty, School of chemistry, Elena E. Stashenko

INTRODUCCIÓN

La acción directa o indirecta del oxígeno molecular sobre los sustratos presentes en los sistemas orgánicos e inorgánicos conduce a la oxidación de los mismos. Algunas de las consecuencias de este proceso en los alimentos son la rancidez y el correspondiente *off-flavour*, mientras que en los sistemas biológicos ocurren procesos más complejos y menos obvios asociados con varias patologías y enfermedades [1,2]. El deterioro oxidativo se conoce comúnmente como autooxidación, fotooxidación u oxidación enzimática. En la autooxidación, los ácidos grasos insaturados se deterioran, por la acción de agentes como el calor, la radiación o iones metálicos; en la oxidación enzimática, enzimas, como la lipoxigenasa catalizan el deterioro de los sustratos lipídicos, y en la fotooxidación el deterioro es iniciado por la acción de fotones [3-5]. Debido a la importancia de la radiación sobre los procesos vitales y cotidianos y, en particular, debido a la acción de la radiación ultravioleta sobre los mismos, en los últimos años se ha resaltado su estudio ya que se sabe que es la radiación causante del daño a moléculas biológicas como el ADN, las proteínas y los lípidos [6-12]. Ello se ve reflejado no solamente en enfermedades como el cáncer, sino también en las relaciones entre los seres vivos presentes en los ecosistemas [13-17]. La radiación UVA (320-380 nm) está relacionada con el fenómeno de estrés oxidativo, en donde radicales como el hidroxilo inician los fenómenos de peroxidación lipídica. Se ha determinado que los mecanismos de defensa, en contra del efecto causado por la radiación UVA, están relacionados con las moléculas antioxidantes [18].

Los antioxidantes son sustancias que retardan o inhiben la degradación oxidativa y se utilizan ampliamente en la industria para prevenir la formación de colores, *off-flavour* y compuestos que se originan durante la oxidación de los lípidos. Los antioxidantes pueden ser de origen natural o sintético. La mayoría de los antioxidantes utilizados en los alimentos para humanos y animales son de origen sintético; entre ellos, se encuentran el BHT, el BHA, la TBHQ y el PG. Algunas de estas sustancias han sido evaluadas en animales de experimentación, encontrándose, por ejemplo, que el BHA ocasiona la proliferación de las células del tubo digestivo, junto con la disminución del crecimiento en

las ratas, el BHT produce lesiones hemorrágicas y el PG forma compuestos coloreados en presencia de trazas de hierro, además de descomponerse a altas temperaturas [19]. Debido a los efectos encontrados en animales de experimentación, en países como Japón ha sido prohibido el consumo de BHA y en los Estados Unidos de América el BHA y el BHT se encuentran en el estatus tres de la reglamentación para drogas, lo cual indica que su toxicidad debe ser evaluada con frecuencia [3,20-23]. Aunque muchos de estos efectos no son extrapolables a la especie humana por las diferencias fisiológicas y anatómicas, los consumidores perciben que las sustancias naturales son más inocuas que las sustancias sintéticas y, por ello, las prefieren. Ante esto, y sabiendo que las sustancias naturales se utilizan desde la antigüedad, varios centros de investigación, entre ellos el Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander, vinculado al Centro de Investigación en Biomoléculas, CIBIMOL, están buscando, dentro de las fuentes naturales, nuevas sustancias con propiedades antioxidantes, que puedan reemplazar a los antioxidantes sintéticos comúnmente utilizados, claro está, después de un estudio exhaustivo de sus propiedades fisicoquímicas y toxicológicas.

Desde los años cincuenta se han realizado múltiples investigaciones tendientes a extraer compuestos con propiedades antioxidantes a partir de plantas, fue así como se encontraron las sustancias conocidas como flavonoides y tocoferoles [22-30]. Ahora bien, aunque los estudios con extractos han sido amplios, la información encontrada sobre la acción protectora de los aceites esenciales y sus componentes es relativamente escasa [31-40]. Sin embargo, varios trabajos se han realizado en el Laboratorio de Cromatografía de la UIS sobre el efecto protector de aceites esenciales contra el deterioro oxidativo, causado por altas temperaturas, radiación de microondas, iones metálicos y radiación UVA, usando los sustratos tipo aceite vegetal y ácido linoleico. En la mayoría de los ensayos se encontró un efecto de inhibición de la degradación oxidativa [41-45].

El objeto de esta investigación fue evaluar el comportamiento de los aceites esenciales de *Origanum vulgare* L., *Rosmarinus officinalis* L. y *Coriandrum sativum* L. durante el deterioro oxidativo causado por radiación UVA-VIS a emulsiones. Para llevar a cabo estos ensayos fue escogida una emulsión como sustrato lipídico porque, aunque estos aceites

esenciales ya habían sido evaluados en aceite vegetal, la acción de las sustancias antioxidantes puede variar desde el efecto antioxidante hasta el pro-oxidante, de acuerdo con el medio de reacción (partición) [46-62]. Para evaluar el efecto de la adición de estos aceites esenciales se ejecutó el seguimiento del deterioro del ácido linoleico y la generación del hexanal en la forma de sus derivados, éster metílico e hidrazona, por las técnicas HRGC-FID y HRGC- μ ECD, respectivamente [41,43]. La utilización de dos técnicas analíticas de medición se realizó con el objeto de comparar los valores de actividad antioxidante obtenidos, puesto que el empleo de diferentes técnicas analíticas puede incidir sobre la respuesta observada. Por ejemplo, en los estudios realizados por Puertas, M. (2002), se muestra que para una concentración de 20.00 g/L de aceite esencial de cilantro en aceite vegetal de girasol, las actividades antioxidantes medidas a través de la cuantificación del ácido linoleico y del hexanal fueron 57.9 y -15.6%, respectivamente [63].

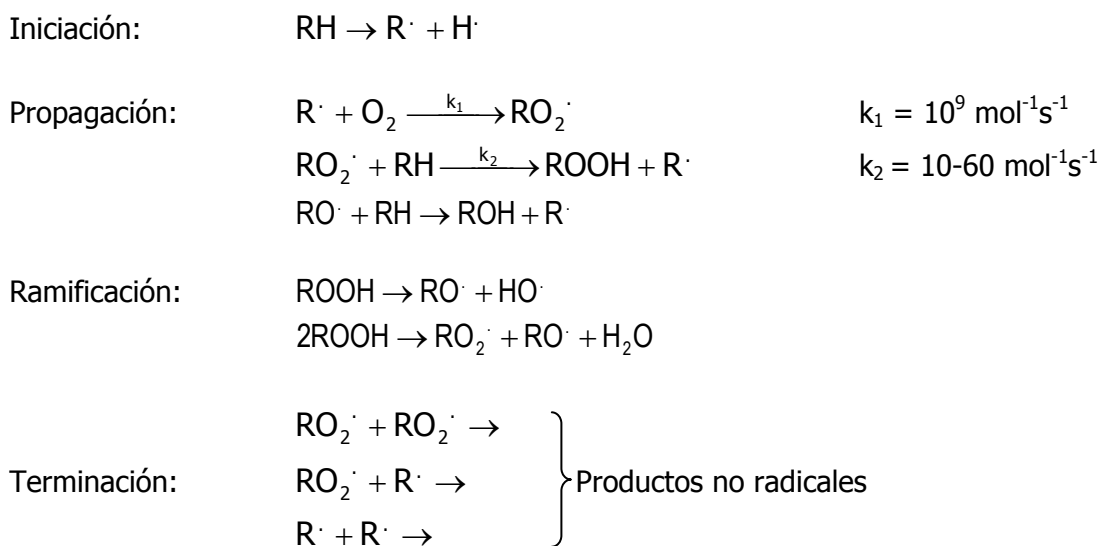
Los resultados parciales de esta investigación, titulados "Degradación de margarinas por radiación ultravioleta: estudio previo para evaluar el efecto protector de aceites esenciales" y "*HRGC/FID/ECD determination of the protecting effect of essential oils during the UV-induced oxidative degradation of margarine emulsions*", fueron presentados en forma de posters en el IX Congreso Latinoamericano de Cromatografía, COLACRO, realizado en febrero de 2002 en Cartagena, Colombia y en el 24th *International Symposium on Chromatography*, celebrado en Leipzig, Alemania en septiembre de 2002.

2. ESTADO DEL ARTE

2.1 DETERIORO OXIDATIVO

Los procesos de deterioro oxidativo, DO se presentan en la mayoría de los sistemas orgánicos e inorgánicos produciendo efectos adversos que se evidencian en los cambios de color, sabor y olor. Los mecanismos a través de los cuales puede ocurrir el DO, conocidos como autooxidación, fotooxidación y oxidación enzimática, se describen a continuación.

2.1.1 Autooxidación. La autooxidación es esencialmente una reacción en cadena de radicales, dividida en las etapas de iniciación, propagación, ramificación y terminación [64-66].



En la etapa de iniciación, se forma un radical alquílico por medio de la abstracción de un átomo de hidrógeno de un ácido graso. Esta abstracción se realiza preferencialmente en

los hidrógenos metilénicos de ácidos grasos poliinsaturados, ya que la energía necesaria para la abstracción de esta clase de hidrógenos es relativamente baja (272 kJ/mol), comparada con la requerida para abstraer los hidrógenos de grupos metílicos y metilénicos ubicados en ácidos grasos saturados e insaturados (322-422 kJ/mol) [64]. Dentro de los posibles agentes que pueden iniciar la ruptura homolítica de un enlace carbono-hidrógeno se encuentran la radiación, los radicales, el calor, los iones metálicos [67-71] y en el caso particular de los sistemas vivos, las especies reactivas de oxígeno, ROS, producidas en altas concentraciones bajo estados de estrés oxidativo. Entre las ROS, el hidroxilo ($\text{OH}^\cdot$), el anión superóxido (O_2^-), el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) pueden actuar como iniciadores de la reacción en cadena, al abstraer un átomo de hidrógeno o adicionarse al doble enlace carbono-carbono de un ácido graso [18,72-76].

Una vez formado el radical alquílico $\text{R}^\cdot$, éste reacciona rápidamente con el oxígeno triplete para formar el radical peroxilo $\text{RO}_2^\cdot$, el cual al abstraer un átomo de hidrógeno de un ácido graso produce una molécula de hidroperóxido ROOH a través de una reacción, cuya velocidad es baja debido a que los radicales peroxilo son relativamente estables comparados con los radicales $\text{R}^\cdot$ y $\text{RO}^\cdot$. En la **Figura 1** se muestra la formación de 4 hidroperóxidos a partir del ácido linolénico. La proporción de estos compuestos depende del punto de ataque del oxígeno triplete y de la tendencia de los hidroperóxidos a sufrir reacciones de ciclación [20].

Los hidroperóxidos formados tienen una estabilidad alta con respecto a los otros compuestos presentes en el medio de reacción y se requiere que agentes iniciadores (calor, radiación, iones metálicos) proporcionen las condiciones necesarias para su deterioro. Así por ejemplo, para la generación de radicales alcóxilo y peróxilo a partir de ellos se necesitan aproximadamente 44 y 90 kcal/mol para la disociación de los enlaces RO-OH y ROO-H , respectivamente. El caso particular de los iones metálicos sobre los hidroperóxidos se muestra en la siguiente reacción [3]:

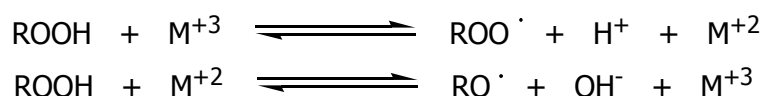
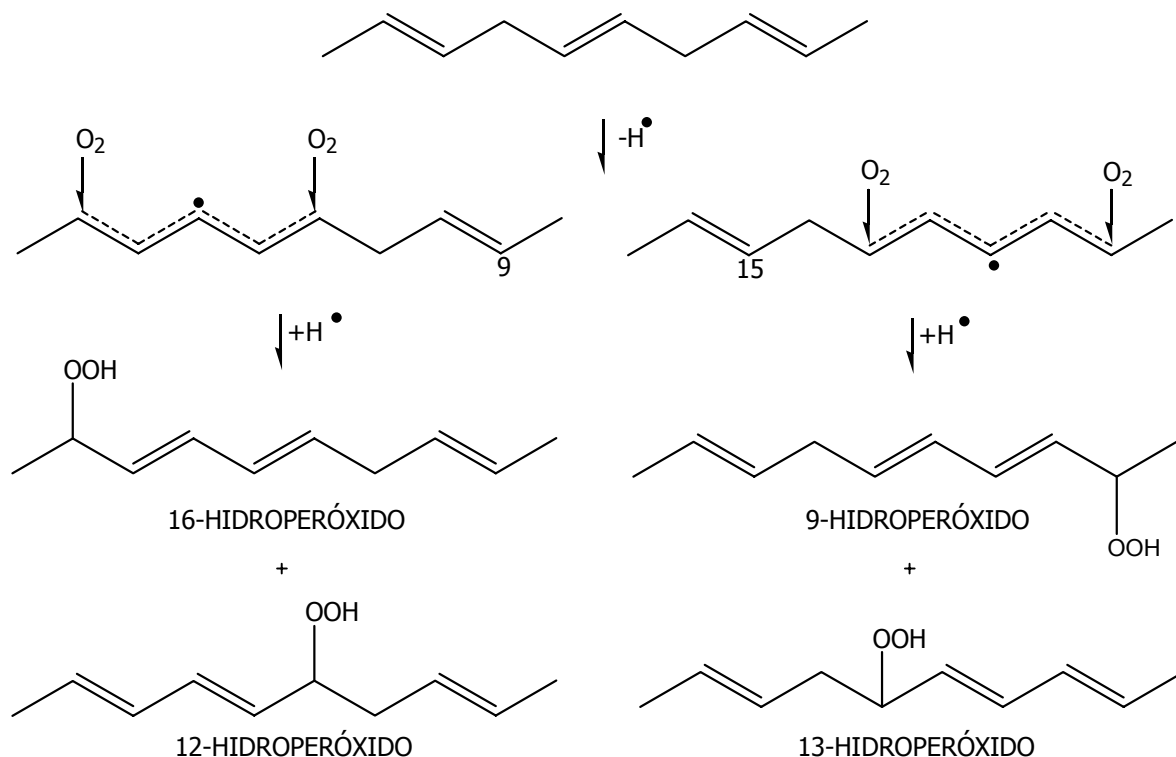


Figura 1. Formación de hidroperóxidos durante la oxidación del ácido linolénico.



Los radicales peroxilo y alcoxilo están involucrados en reacciones de competencia, tales como la escisión β y la ciclación por reordenamiento intramolecular. La escisión β , esquematizada en la **Figura 2**, es la ruta por medio de la cual se puede explicar la formación de productos volátiles causantes del *off-flavour* de los alimentos; entre estos productos se encuentran pentano, pentanal, hexanal, heptanal, octanal, nonenal, decenal, nonadienal y decadienal, entre otros [64, 77]. En la ruta se muestra cómo a partir del hidroperóxido se origina un alcoxilo, que puede sufrir dos tipos de ruptura A y B (Véase **Figura 2**). En la ruptura tipo B preferida energéticamente, el enlace carbono-carbono más alejado del doble enlace se rompe originando los compuestos oxo-eno u oxo-dieno que son estabilizados por resonancia. En el caso particular de la escisión β del hidroperóxido del ácido linoleico, indicada en la **Figura 3**, se obtienen los productos de fragmentación pentano y 2,4-decadienal.

Figura 2. Escisión β de los monohidroperóxidos.

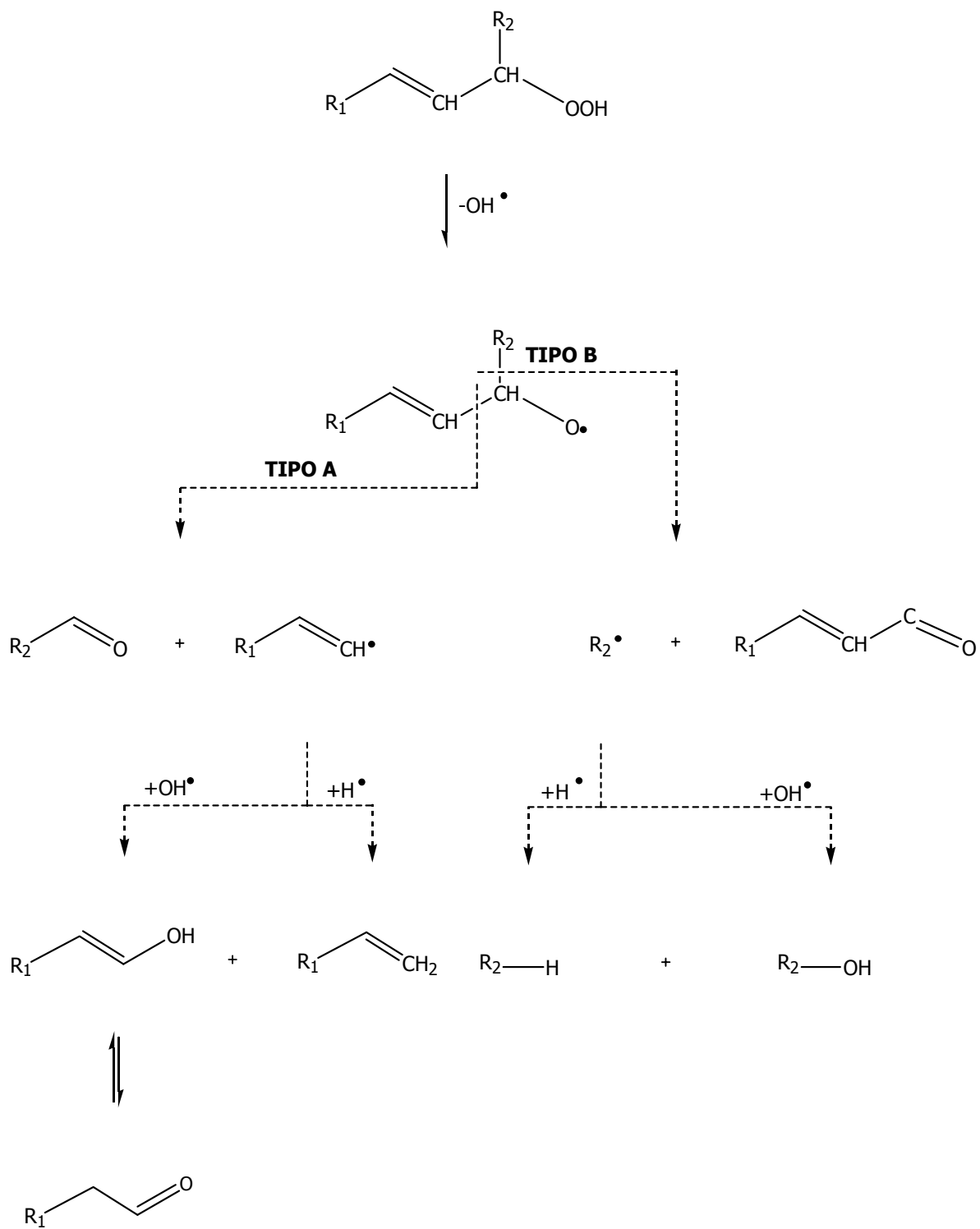
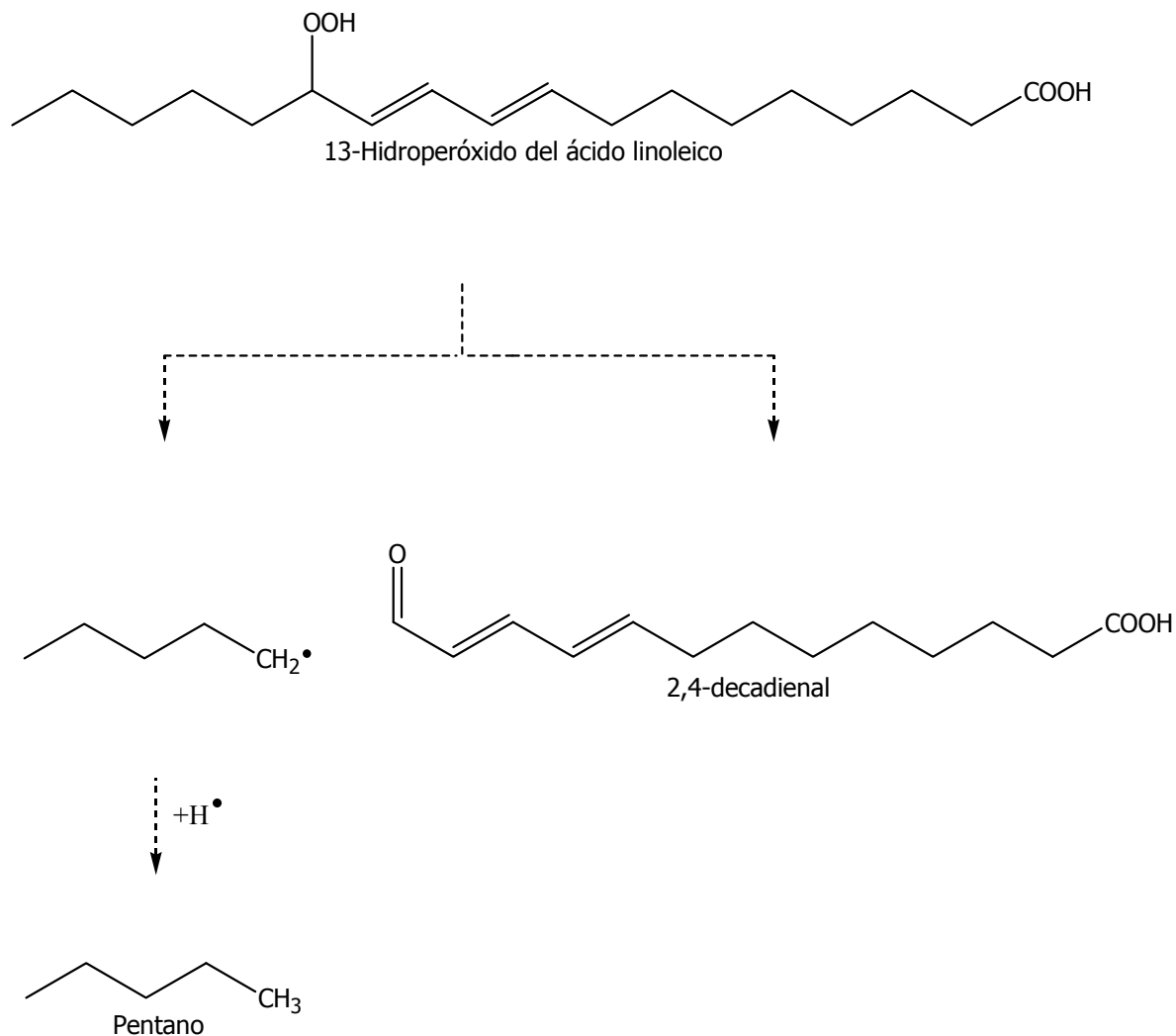
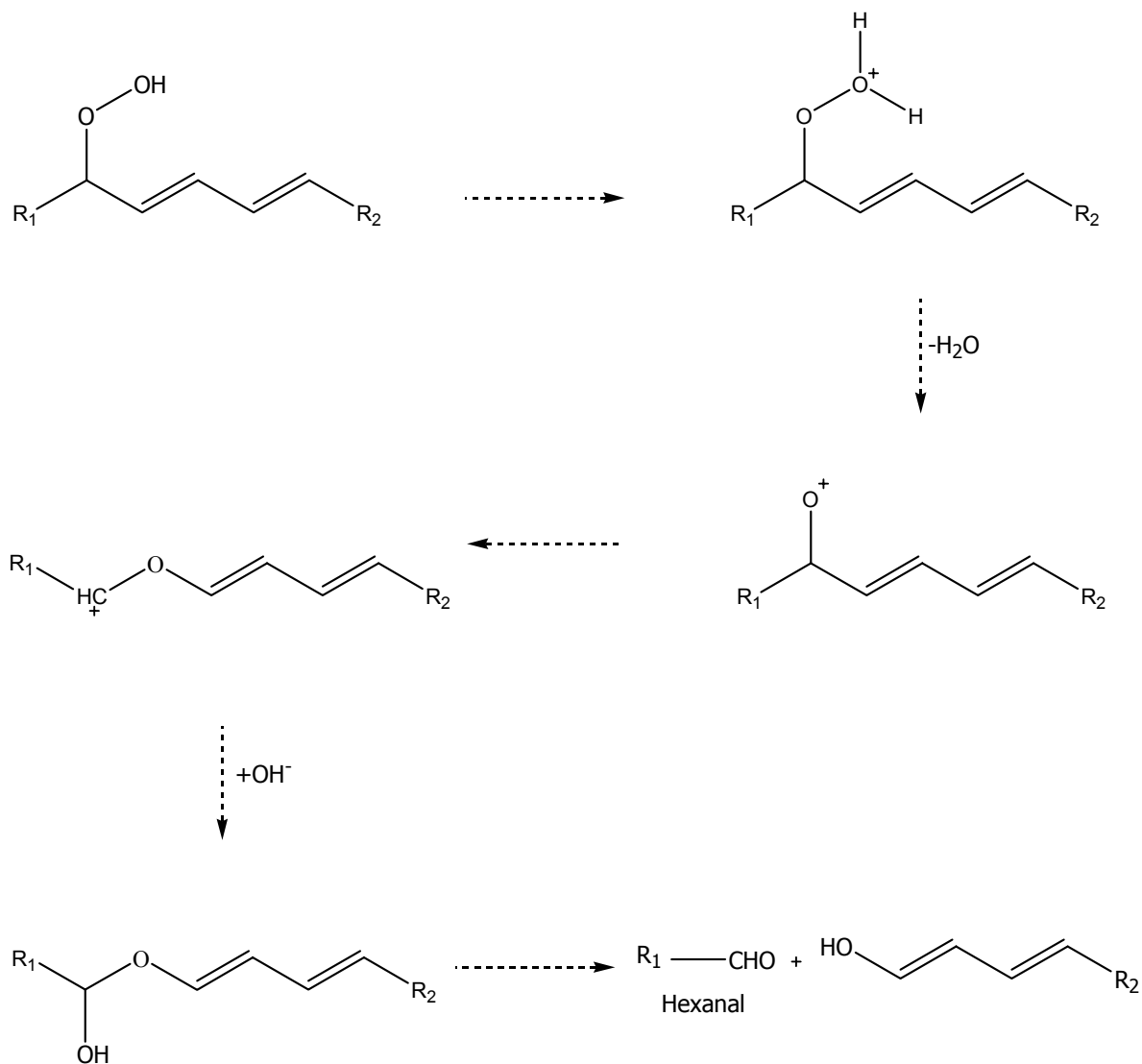


Figura 3. Escisión β del monohidroperóxido del ácido linoleico.



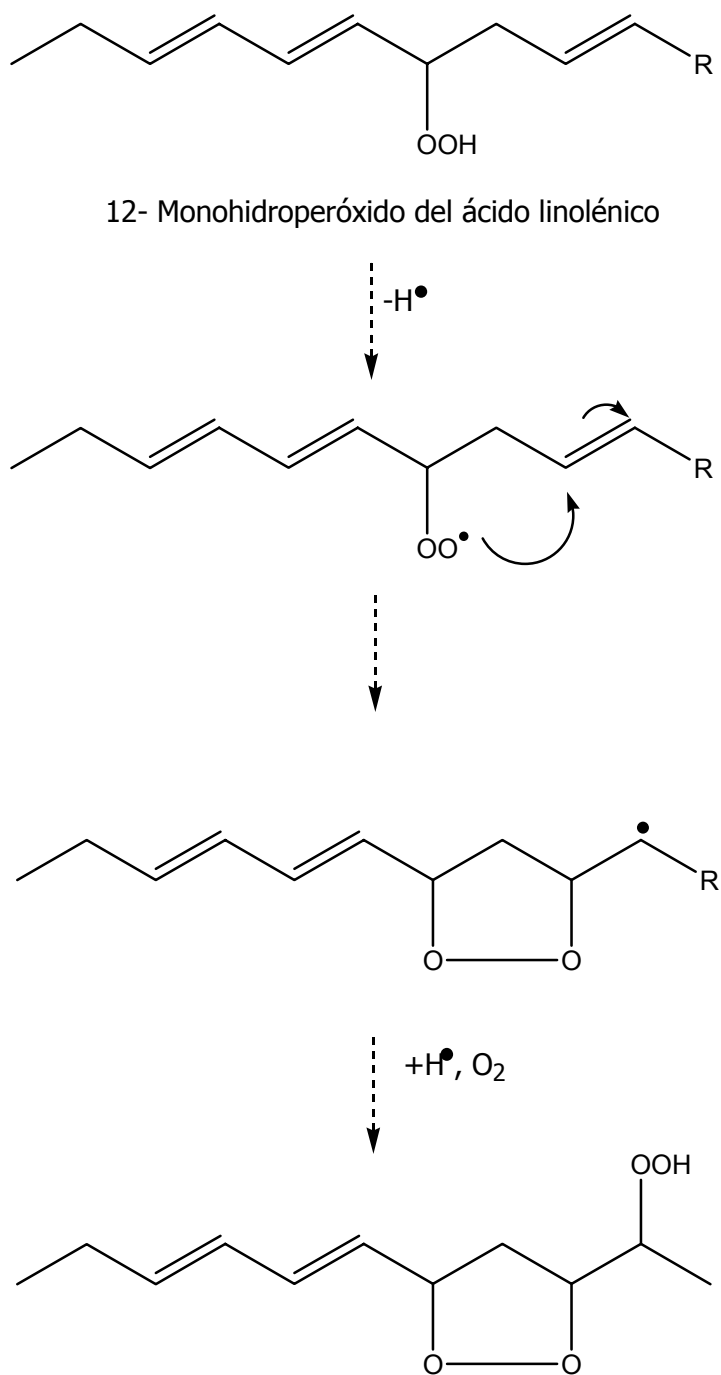
La generación del hexanal, entre los principales compuestos volátiles derivados de la oxidación del ácido linoleico, es un tema que permanece en discusión abierta, pero su formación en soluciones acuosas ocurre a través de la protonación del grupo hidroperóxido, el cual da origen a un catión oxo que sufre una reacción de inserción sobre el doble enlace adyacente, dando origen al oxo-ácido y al hexanal, tal como se indica en la **Figura 4.**

Figura 4. Formación del hexanal en medios acuosos [$R_1 = \text{CH}_3(\text{CH}_2)_4$, $R_2 = (\text{CH}_2)_7\text{COOH}$].



Además de las reacciones de escisión β , los hidropéroxidos de ácidos grasos experimentan reacciones de ciclación intramolecular por medio de las cuales dan origen a epoxihidropéroxidos, epóxidos y bicicloendopéroxidos. En la **Figura 5** se indica la ruta de formación de un hidroperoxi-epidioxido a partir del ácido α -linolénico [3].

Figura 5. Formación de un hidroperoxi-epidioxido a partir del ácido α -linolénico.



Durante la etapa final del mecanismo de la autooxidación, los radicales formados en las etapas previas se combinan para producir moléculas neutras que contienen dos o más ácidos grasos unidos a través de un grupo peróxido, éter o carbono-carbono. Esta combinación requiere poca energía, pero está limitada por la concentración y orientación de los radicales. En el caso particular de la fritura de aceites, los radicales se combinan produciendo dímeros y oligómeros que contribuyen al incremento de la viscosidad del aceite [20].

2.1.2 Fotooxidación. La fotooxidación puede transcurrir a través de dos mecanismos: el directo y el de sensibilización. En el primer caso la acción directa de un fotón sobre una molécula de ácido graso ocasiona la escisión homolítica del enlace carbono-hidrógeno menos energético; mientras que en el segundo los fotones son absorbidos por sustancias sensibilizadoras, tales como clorofilas, porfirinas, mioglobina, riboflavinas y colorantes sintéticos, los cuales disipan este exceso de energía por medio de dos rutas que originan la formación de hidroperóxidos. En la **Figura 6** se muestra que el sensibilizador, Sens, una vez absorbe el fotón, se convierte en una molécula excitada inestable $^1\text{Sens}^*$, la cual puede perder el exceso de energía por medio de tres mecanismos diferentes denominados así: conversión interna, emisión de luz y cruces intersistemas. Cuando sucede la conversión interna desde un estado de mayor energía hasta uno de energía más baja, ésta se disipa en forma de calor, mientras que la emisión de luz puede suceder a través de los fenómenos de fluorescencia y/o fosforescencia. La fluorescencia ocurre cuando la especie $^1\text{Sens}^*$ pasa a su estado fundamental $^1\text{Sens}$ y la fosforescencia se presenta cuando hay cruces intersistemas, es decir, cruces entre estados energéticos de diferente multiplicidad de espín, en este caso la especie $^1\text{Sens}^*$ se convierte primero en $^3\text{Sens}^*$ y luego pasa a su estado fundamental $^1\text{Sens}$ [4,78-80].

El sensibilizador en estado triplete excitado $^3\text{Sens}^*$ es más estable que en estado singulete excitado, por lo que su tiempo de vida es más prolongado, y es justamente la especie que ocasiona la producción de hidroperóxidos a través de las rutas mostradas en la **Figura 7**. En la ruta tipo I la especie $^3\text{Sens}^*$ interactúa con el ácido graso a través de reacciones de

transferencia de electrones o de átomos de hidrógeno originando radicales alquílicos que reaccionan con el oxígeno molecular triplete. En la ruta tipo II la especie $^3\text{Sens}^*$ le transfiere la energía al oxígeno que se encuentra en estado triplete generando el estado singulete $^1\text{O}_2$, el cual reacciona con los ácidos grasos insaturados. La velocidad de la ruta I depende de la clase y concentración de los sensibilizadores y sustratos, mientras que la velocidad de la ruta tipo II depende de la solubilidad y la concentración del oxígeno, de tal modo que cuando el oxígeno se encuentra en baja concentración hay un desplazamiento de la ruta tipo II hacia la I. En el caso particular de los alimentos que contienen agua con la disponibilidad de oxígeno baja, la ruta I prevalece [80].

Figura 6. Transiciones electrónicas de una molécula o sensibilizador.

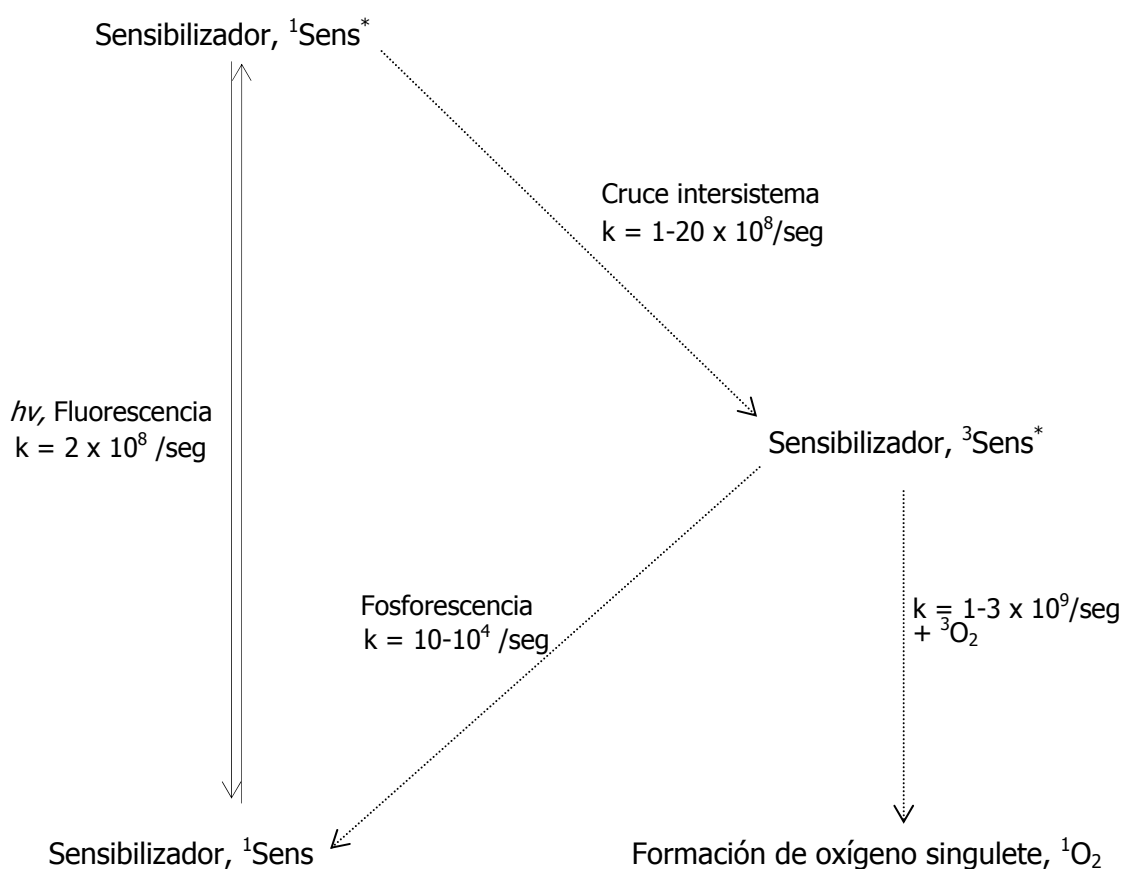
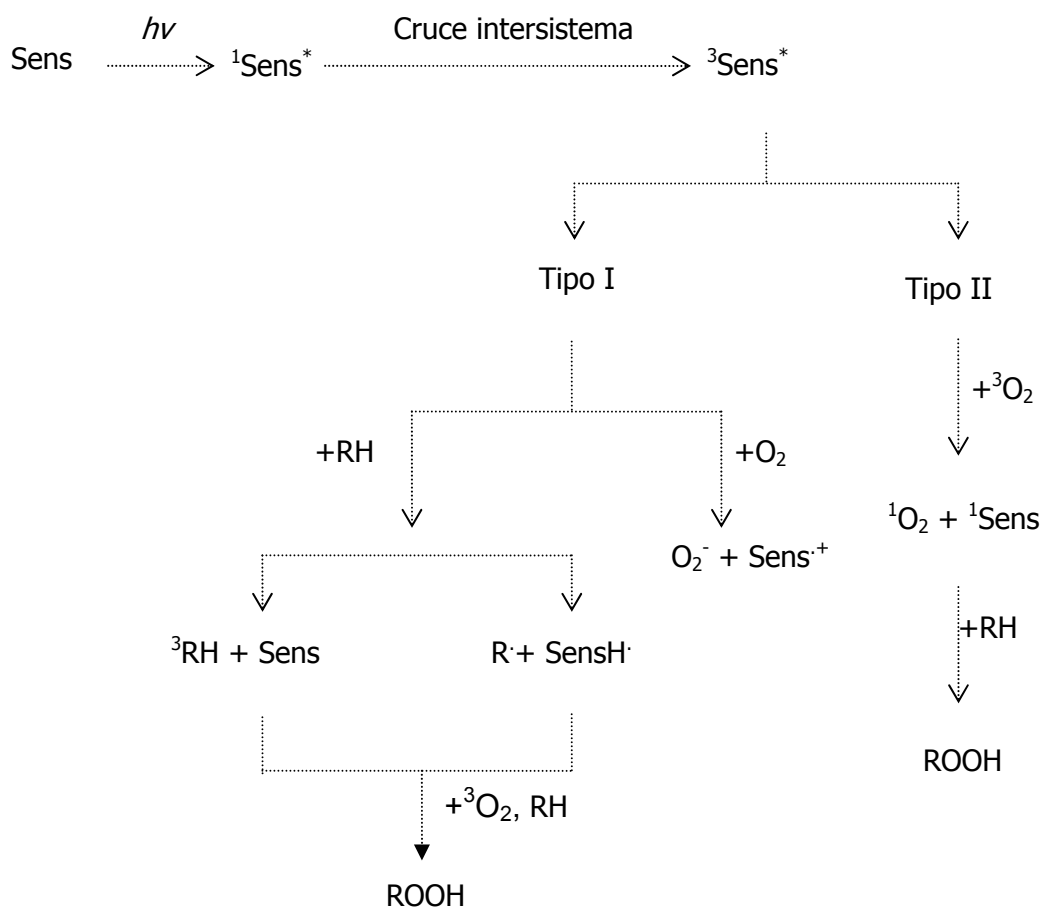


Figura 7. Producción de hidroperóxidos a través del mecanismo de fotosensibilización.

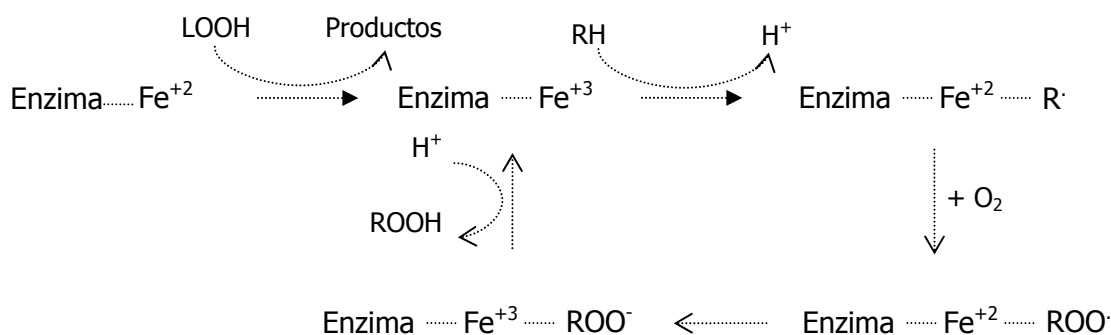


2.1.3 Oxidación enzimática. Las enzimas denominadas lipoxigenasas que están presentes en muchas plantas y también en los eritrocitos y leucocitos de los tejidos animales, catalizan la oxidación de algunos ácidos grasos insaturados hacia monohidroperóxidos a través de reacciones que requieren poca energía de activación; por ejemplo, para la peroxidación enzimática del ácido linoleico se requieren aproximadamente 17 kJ/mol. La eficacia de la acción enzimática depende de la estructura del ácido graso y de la especificidad de la enzima. El ácido graso debe contener el sistema 1-*cis*-4-*cis*-pentadieno para que la lipoxigenasa catalice la oxidación y en cuanto a la especificidad, las

enzimas de origen vegetal “prefieren” a los ácidos grasos linoleico y linolénico, mientras que las de procedencia animal “prefieren” al ácido graso araquidónico [81].

El mecanismo de oxidación enzimática indicado en la **Figura 8** muestra cómo a partir de una molécula de ácido graso se obtiene un radical alquílico con la intervención de la forma férrica de la enzima lipoxigenasa. Una vez formado el radical alquílico reacciona con el oxígeno molecular, generando el radical peroxilo, el cual es reducido hasta el anión peroxilo en una reacción catalizada por la forma ferrosa de la lipoxigenasa. En la etapa final este anión se convierte a hidroperóxido, sustrayendo un protón de la molécula de ácido graso. Los hidroperóxidos formados pueden servir como precursores de compuestos con actividad biológica o ser utilizados como odorizantes [82,83].

Figura 8. Peroxidación lipídica catalizada por enzimas.



2.2 ANTIOXIDANTES

Un antioxidante se define de forma general como “cualquier sustancia que cuando está presente en concentraciones bajas, inhibe o previene la oxidación de un sustrato”. De igual modo, desde el punto de vista biológico se define como “aquel compuesto que protege a los sistemas vivos de los agentes que causan deterioro oxidativo” [77].

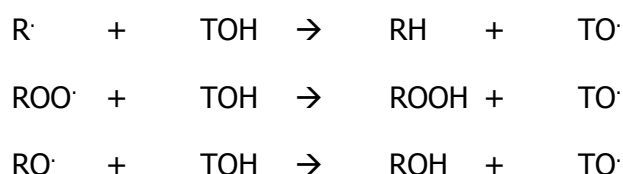
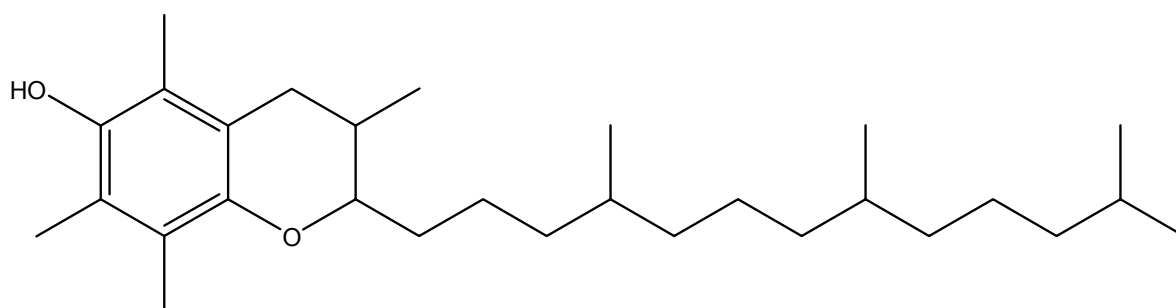
Según su origen, los antioxidantes pueden ser clasificados como naturales o sintéticos. El término "natural", generalmente se refiere a las sustancias que pueden ser extraídas de las plantas o tejidos animales, o aquellas que se forman como consecuencia de la cocción o procesamiento de los alimentos. La mayoría de los antioxidantes naturales son compuestos fenólicos, por ejemplo, tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos [84-95]. Los tocoferoles ampliamente utilizados se clasifican como tocoferoles (TOH) y tocotrienoles (TOH-3) y en cada una de esas dos clases hay cuatro isómeros (α -, β -, γ -, δ -) completando un total de ocho compuestos, entre los cuales el α -tocoferol es el que posee mayor efecto protector sobre los aceites comestibles. Una de las probables explicaciones a esta diferencia de reactividad se obtiene a partir de las formas de resonancia que presenta cada estructura. Los radicales formados de las estructuras α - y β - pueden deslocalizar el electrón a través de tres formas de resonancia, mientras que las estructuras γ -, y δ - solo presentan dos estructuras de resonancia. Los antioxidantes sintéticos también son en su mayoría compuestos fenólicos, a los cuales se les han introducido diversos grupos alquílicos para aumentar su solubilidad en grasas y aceites; entre los más utilizados se encuentran el butil hidroxianisol (BHA), el butil hidroxitolueno (BHT), la *ter*-butil hidroquinona (TBHQ) y el propilgalato (PG) [96].

Los antioxidantes, según el mecanismo de acción se dividen en dos tipos: antioxidantes de ruptura de cadena, ARC, y antioxidantes preventivos, AP. Los ARC, conocidos también como antioxidantes primarios inhiben la etapa de propagación cuando le transfieren un átomo de hidrógeno a los radicales generados durante la oxidación ($R\cdot$, $RO\cdot$, $RO_2\cdot$), reduciéndolos. Los AP, conocidos como antioxidantes secundarios, previenen la etapa de iniciación al atrapar, barrer o formar complejos con sustancias iniciadoras como oxígeno singlete, oxígeno triplete o iones metálicos, además pueden actuar como sinergistas con los ARC. Los sinergistas son compuestos que aunque tienen poca o nula actividad antioxidante aumentan la actividad de los ARC; algunos ejemplos de sinergistas son la lecitina, los aminoácidos y los ácidos cítrico, fosfórico, citracónico y fumárico [97].

Como se mencionó anteriormente la mayoría de los antioxidantes primarios y secundarios contienen grupos fenólicos al igual que el α -tocoferol, razón por la cual se supone que los

mecanismos de su acción son similares. En la **Figura 9** se observan la estructura del α -tocoferol y las reacciones que ocurren entre él y los radicales formados durante el deterioro oxidativo. En todas estas reacciones el α -tocoferol cede el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo a los radicales alquilo, peroxilo y alcoxilo de un ácido graso produciendo especies no radicales estables (RH, ROOH, ROH) y el radical llamado tocoferoxilo ($\text{TO}\cdot$). Este último radical se estabiliza por la deslocalización del electrón en el anillo aromático, pero además puede reaccionar con radicales o moléculas neutras de tocoferol dando origen a tocoquinonas (TO) y/o compuestos diméricos (TO-OT) [3,20].

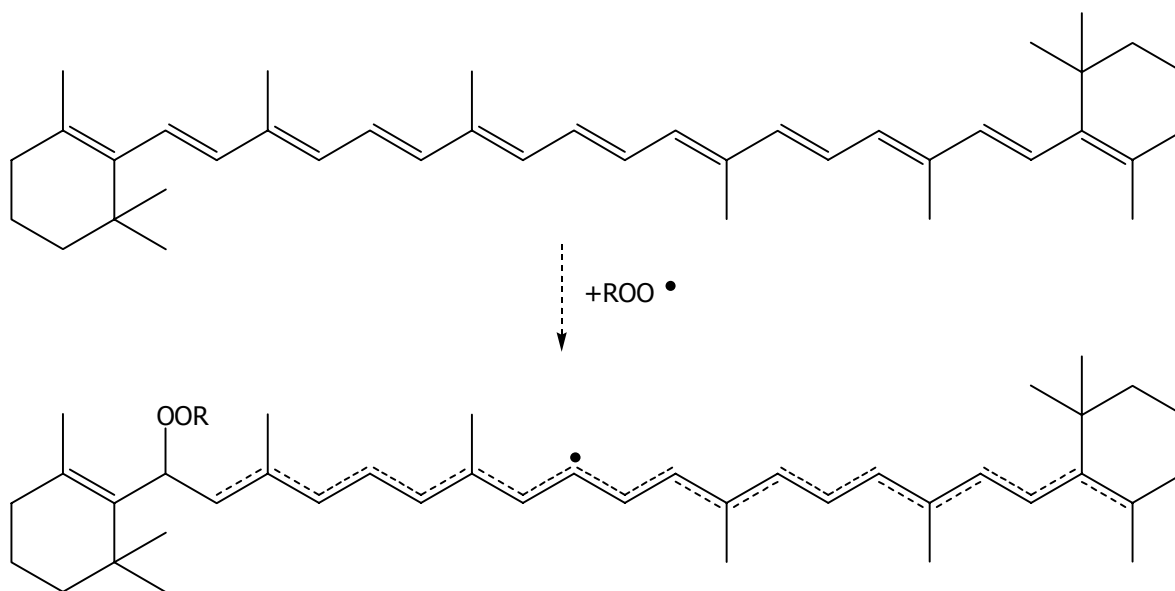
Figura 9. Estructura del α -Tocoferol y sus respectivas reacciones con radicales alquílicos.



Los carotenoides, al igual que los tocoferoles, poseen propiedades antioxidantes, pero su modo de acción es diferente, ya que actúan como “barredores” o “secuestradores” de radicales y “atrapadores” de oxígeno singlete. En la **Figura 10** se indica cómo un carotenoide “barre” un radical peroxilo produciendo otra especie radicalaria que es más estable en comparación con el radical peroxilo debido al fenómeno de resonancia. Además de esto, la acción de los carotenoides sobre el oxígeno singlete los convierte en

sustancias apropiadas para la protección contra el deterioro ocasionado por la fotooxidación tipo II [78].

Figura 10. Atrapamiento de radicales peroxilo por carotenoides.

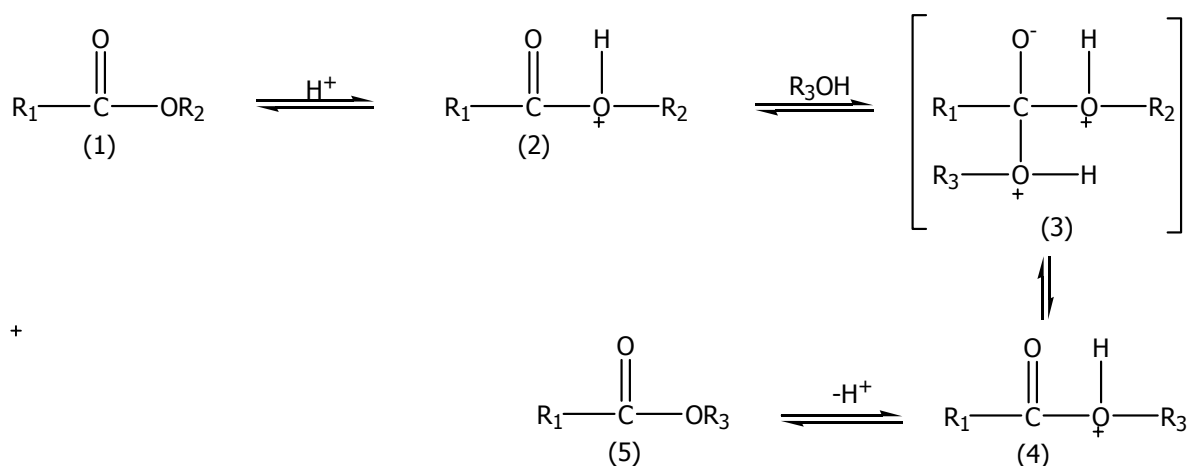


2.3 MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La actividad de una sustancia de origen sintético o natural durante el proceso de DO puede variar desde antioxidante hasta pro-oxidante, debido a la composición del medio y a la acción de agentes externos, tales como calor o radiación. Para poder estudiar el efecto de cada uno de estos parámetros sobre la medida de la actividad antioxidante, se deben diseñar sistemas modelo, los cuales generalmente contienen las siguientes partes: un sustrato que puede ser grasa, aceite o emulsión, el medio que origina el DO de manera acelerada, como por ejemplo, calor, radiación, iones metálicos y radicales y la técnica analítica para el monitoreo de la reacción [3,98]. La composición del sustrato afecta la ubicación del antioxidante en el medio de reacción y, por lo tanto, su eficiencia en el sistema modelo dado. Son varios los estudios que han permitido establecer la tendencia general de acción de los antioxidantes en diferentes tipos de sustratos. Una tendencia

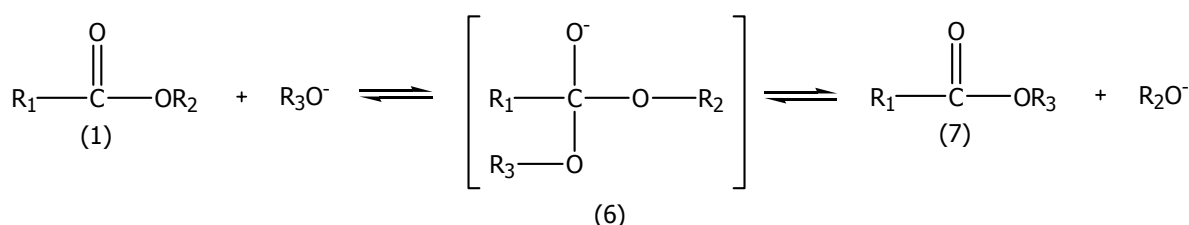
conocida como la “paradoja polar” predice que los antioxidantes hidrofílicos son más efectivos que los lipofílicos en aceites, mientras que los antioxidantes lipofílicos son más efectivos en emulsiones [46-55,97]. En cuanto a la técnica analítica, ésta se escoge de acuerdo con el objetivo del ensayo. Así, por ejemplo, si se desea evaluar el mecanismo de acción del antioxidante, se pueden utilizar técnicas de atrapamiento de radicales, pero si se busca estudiar la capacidad de protección de un sustrato contra el DO se realiza el seguimiento de compuestos, tanto degradados como generados. Las espectroscopías ESR y UV-VIS se utilizan en los ensayos de atrapamiento de radicales, dentro de los cuales los más empleados son el del catión radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-ácido sulfónico) (ABTS) y el del 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), mientras que las técnicas IR, HRGC, HPLC y los métodos calorimétricos, conductimétricos y titrimétricos, generalmente se usan para determinar los compuestos generados o degradados. En particular, las técnicas HRGC y HPLC son ampliamente utilizadas para el análisis de aldehídos, cetonas, alcoholes, hidroperóxidos y ácidos grasos [99,100]. Los ácidos grasos se determinan en forma de ésteres metílicos, por cromatografía de gases de alta resolución acoplada a un detector de ionización en llama, HRGC-FID. La obtención de estos derivados se realiza por medio de reacciones de esterificación o transesterificación, catalizadas por ácidos o bases según se indica en las **Figuras 11** y **12** [101-103].

Figura 11. Transesterificación de lípidos catalizada por ácidos.



En la transesterificación catalizada por ácidos, primero ocurre la protonación del lípido y luego, por la adición de un alcohol, se origina el intermediario (3), el cual se puede disociar a través de un estado de transición (4), produciendo el éster (5). Los ácidos minerales clorhídrico y sulfúrico y los ácidos de Lewis, e. g. tricloruro de aluminio y trifluoruro de boro, son los más utilizados para este propósito. El trifluoruro de boro en la forma del complejo de coordinación con metanol es un catalizador muy eficiente, puesto que realiza la esterificación de ácidos grasos libres y la transesterificación de lípidos en tiempos de reacción cortos.

Figura 12. Transesterificación de lípidos catalizada por bases.

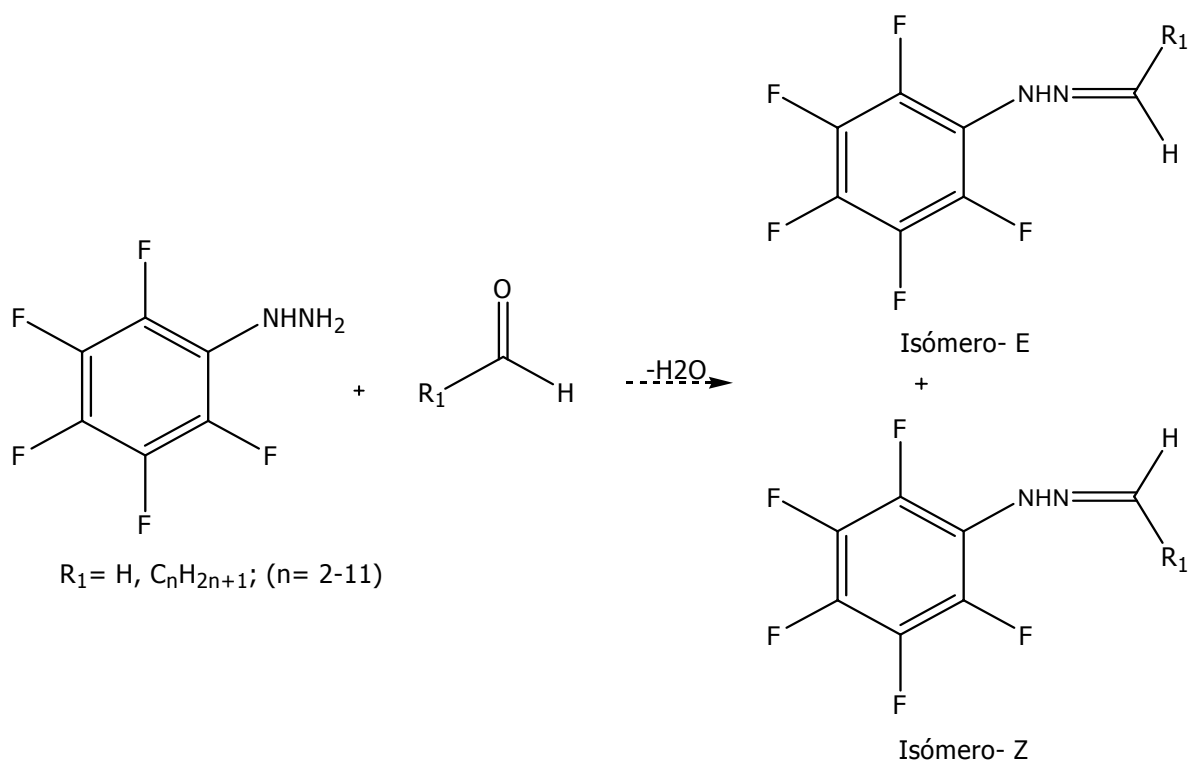


En la transesterificación catalizada por bases (Véase Figura 12), el éster (1) en presencia de una base como el anión alcoholato (R_3O^-) forma un intermediario aniónico (6) que puede disociarse para formar el éster de partida (1) o uno nuevo (7).

La medición de la actividad antioxidante también se lleva a cabo por cuantificación de los compuestos carbonílicos, productos secundarios finales, generados durante el DO [104]. Para realizar esta cuantificación no se utilizan técnicas cromatográficas convencionales, por ejemplo, HRGC-FID, debido a que se obtienen respuestas poco sensibles, gracias a la inestabilidad térmica, alta volatilidad y solubilidad parcial en agua de las moléculas carbonílicas. Para solucionar este inconveniente se emplean técnicas cromatográficas especiales con la derivación de sustancias carbonílicas. La cromatografía de gases es precedida por procedimientos de enriquecimiento en la fase vapor, tales como *Headspace* dinámico y microextracción en fase sólida, SPME [45,105-107]. Estos métodos, al ser combinados con la derivación química, permiten el aumento de la sensibilidad en detectores convencionales como el FID, ya que durante el proceso de derivatización se

obtienen compuestos térmicamente estables y menos volátiles. Además, al aumentar la “especificidad” de la molécula por la introducción de nuevos grupos funcionales, se facilita el uso de detectores selectivos, tales como NPD, FPD o ECD. Entre los agentes derivatizantes más usados se encuentran: pentafluorofenilhidracina (PFPH), dansilhidracina-*o*-(2,3,4,5,6-pentafluorbencil)-hidroxilamina, (DMSH), dinitrofenilhidracina (DNPH), *n*-metil-hidracina-1-metil-1-(2,4-dinitrofenil)-hidracina, (NMH), 4-amino-3-hidracina-5-mercapto-1,2,4-triazol (AHMT) y 2-hidracinobenzotiazol (HBT), entre otros [108-110]. En la **Figura 13**, se muestra la reacción de derivatización de un aldehído con la PFPH, en donde se obtiene una mezcla de las hidrazonas isoméricas *sin* (Z-) y *anti* (E-). Este procedimiento de derivatización ha sido estandarizado por Stashenko E. E. y colaboradores, quienes además lo han empleado para el seguimiento de los compuestos carbonílicos volátiles, presentes en la orina, aceites y emulsiones durante el proceso de DO [31,41,45].

Figura 13. Derivatización de aldehídos con pentafluorofenilhidracina.



2.4 ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales, AE's, se definen desde el punto de vista químico, botánico e industrial como el conjunto de metabolitos secundarios volátiles de la planta, que evocan su fragancia y pueden ser aislados de ella por métodos de arrastre con vapor o hidrodestilación. Los componentes principales de los AE's se denominan terpenos y su estructura química fue establecida por Wallach en 1887, quien además propuso la llamada regla del isopreno, en la cual los terpenos son considerados productos de la fusión de dos o más moléculas de isopreno, C_5H_8 . La fórmula general de los terpenos es $(C_5H_8)_n$, y para valores de n igual a 2, 3 y 4, éstos se denominan monoterpenos ($n=2$), sesquiterpenos ($n=3$) y diterpenos ($n=4$). Los AE's contienen además de monoterpenos y sesquiterpenos: ésteres, aldehídos, alcoholes, cetonas, acetales, fenoles, ácidos grasos, cumarinas y compuestos heterocíclicos [111,112]. Algunas de las estructuras de las sustancias, que pueden estar presentes en los AE's se muestran en la **Figura 14**:

Los AE's han sido utilizados desde hace mucho tiempo en la industria de fragancias y sabores, pero en la búsqueda de sustancias naturales y ambientalmente amigables, su aplicación ha sido expandida al ser empleados como posibles agentes antimicrobianos, antioxidantes y de protección de cultivos. La utilización de un AE en el ámbito industrial depende de su calidad, la cual es establecida con base en propiedades fisicoquímicas, tales como: color, sabor, olor, volatilidad y estabilidad (ante agentes como luz, pH, oxígeno y metales); pero las propiedades varían, a su vez, con la distribución de los componentes presentes en el AE. Sobre esta distribución influyen muchos factores, a saber: tiempo de cosecha, origen geográfico, método de obtención, genotipo y quimiotipo, entre otros [111]. Debido a lo anterior, se hace importante establecer la relación que hay entre la efectividad y la composición de AE's y los parámetros que afectan esta composición.

2.4.1 Aceites esenciales de *Origanum vulgare* L., *Coriandrum sativum* L. y *Rosmarinus officinalis* L. Los aceites esenciales obtenidos de orégano (*Origanum vulgare* L.), cilantro (*Coriandrum sativum* L.) y romero (*Rosmarinus officinalis* L.)

presentan una amplia diversidad en su composición química, según los estudios realizados (Véase **Tabla 1**) [113-140]. Así por ejemplo, Kazarinova, N. V. et al. (2002) determinaron que los compuestos volátiles presentes en el *Origanum vulgare* L., cultivado en Rusia eran principalmente el sabineno (10%), el *cis*-ocimeno (14%), el *trans*-ocimeno (19%) y el cariofileno (12%), mientras que Scheffer, J. J. C. et al. (1986) determinaron que el metilcarvacrol (61%) y *p*-cimeno (13%), entre otros, eran los componentes mayoritarios de la misma especie, proveniente de Turquía. La diferencia en la composición de un aceite esencial no sólo se basa en el origen geográfico, sino también en la fisiología y distribución de los componentes en los diferentes tejidos de la planta. Lassanyi y Lorincz (1967, 1970), utilizando métodos histoquímicos, hicieron el primer reporte sobre la variación de la composición de los AE's obtenidos de frutos y hojas del cilantro, encontrando que el aceite extraído de las hojas contenía en su mayoría aldehídos, mientras que el extraído del fruto fue rico en linalol [133,134].

Figura 14. Estructura de algunos componentes comunes en aceites esenciales

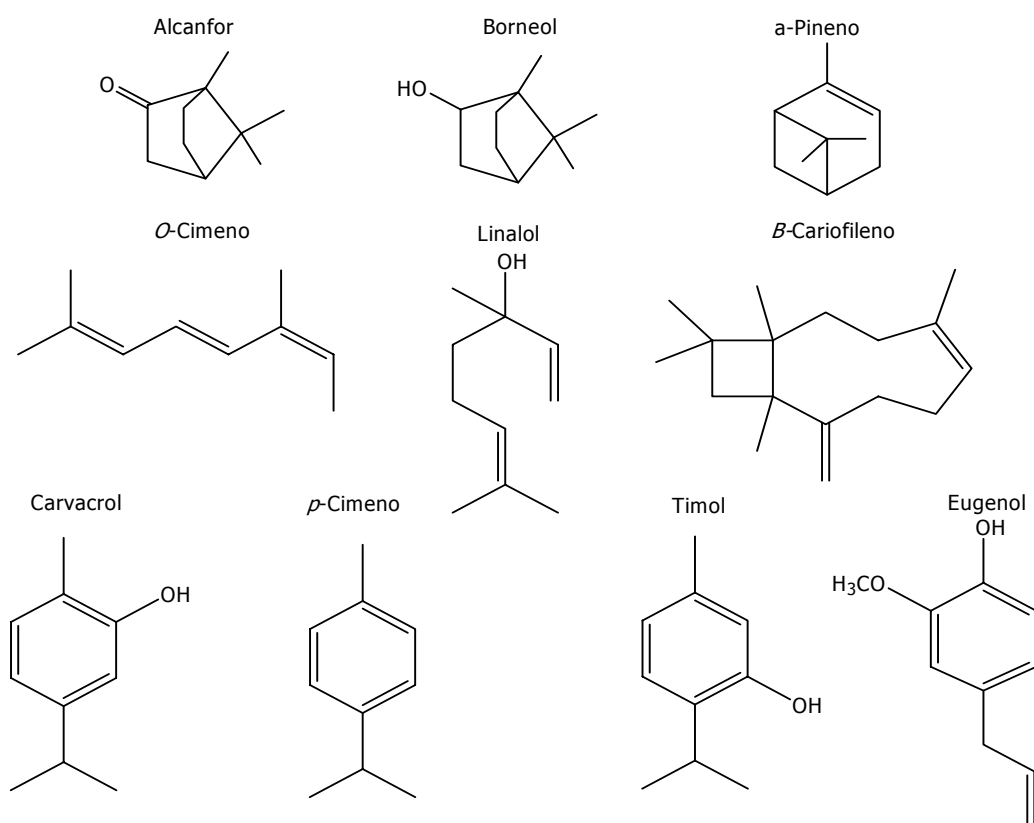


Tabla 1. Composición de los aceites esenciales de orégano, romero y cilantro de diferentes orígenes geográficos.

ESPECIE	COMPOSICIÓN	REFERENCIA
<i>Origanum vulgare</i> L.	Sabineno (10%), mirceno (5%), 1,8-cineol (3%), <i>cis</i> -ocimeno (14%), <i>trans</i> -ocimeno (19%), terpineno (3%), cariofileno (12%), germacreno D (9%), biciclogermacreno (3%), farneseno (4%)	Kazarinova, N. V. et al., 2002 [141]
	Timol (36%), carvacrol (16%), p-cimeno (12%), γ -terpineno (18%), α -terpineno (4%)	Puertas, M. A. et al., 2002 [63]
	p-Cimeno (12%), γ -terpineno (18%), timol-metil-éter (16%), timol (36%)	Salgar, W., 2002 [142]
	Cariofileno (14-31%), germacreno D (10-19%), E,E-farneseno (4-11%)	Tkachenko, K. G. et al., 2002 [114]
	Grupo1- carvacrol/timol, Grupo2- linalol, Grupo3- sesquiterpenos	D'Antuono, L. F. et al., 2000 [118]
	Muuroleno (62%)	Chitra, P. et al., 2000 [120]
	Carvacrol (61%), p-cimeno (13%), γ -terpineno (8%), mirceno (2%)	Scheffer, J. J. C. et al., 1986 [140]
	Sabineno (26%), <i>cis</i> -ocimeno (17%), <i>trans</i> -ocimeno (10%), germacreno D (15%)	Lawrence, B. M., 1979 [126]
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Cis-ocimeno (14%), sabineno (14%), germacreno D (10%), timol, canfeno y carvacrol, en trazas	Maarse, H. Van Os, F. H. L., 1973 [123]
	Alcanfor (31%), 1,8-cineol (18%), α -pineno (11%), limoneno (4%)	Puertas M. A. et al. 2002 [63]

Continuación de la **Tabla 1.**

<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Alcanfor (34%), eucaliptol (17%), canfeno (6%), α -pineno (8%), β -pineno (4%)	Contreras, N., 2002 [143]
	Alcanfor (31%), 1,8-cineol (18%), canfeno (8%), α -pineno (11%), limoneno (4%)	Salgar, W., 2002 [142]
	1,8-Cineol (48-55%), α -pineno (9-11%), alcanfor (6-15%), α -terpineol (3-4%)	Fournier, G. et al., 1989 [139]
	α -Pineno (30-50%), Δ -3-careno (12-13%), bornileno (6-8%), verbenona (3-6%), canfeno (3%), 1,8-cineol (3-8%)	Rosua, J. L. García-Granados, A., 1987 [138]
	α -Pineno (20-25%), 1,8-cineol (15-20%), alcanfor (15-20%), canfeno (8-19%)	Boelens, M. H., 1985 [130]
	Linalol (17%), 1,8-cineol (20%), α -pineno (17%), canfeno (7%)	Rhyu, H. Y., 1979 [129]
	α -Pineno (10%), 1,8-cineol (51%), alcanfor (6%), borneol (5%), canfeno (4%)	Skrubis, B. G., 1972 [125]
<i>Coriandrum sativum</i> L.	Linalol (37%), undecanol (12%), dodecanal (4%), decanal (9%), 2-decenal (5%)	Puertas M. A. et al., 2002 [63]
	Decanal (16%), undecenal (3%), dodecanal (6%), tetradecanol (7%), 2-decen-1-ol (15%), dodecanol (6%), undecanal (6%)	Contreras, N., 2002 [143]
	Limoneno (12%), decanol (9%), 2-decen-1-ol (19%), 1-decanol (16%), 2-decenal (7%)	Delgado, W. A., 2002 [42]
	Linalol, diacetato de 1,1-dodecanol, 1-decanol, 1-decenal, 1-hexadecanol, 1-metil-2-propenil-benceno, 2-decen-1-ol, 2-decenal	Fuentes, H., 1999 [41]

Continuación de la **Tabla 1**

<i>Coriandrum sativum</i> L.	(E)-2- decenal, 2-decen-1-ol, 1-decanol, (E)-2-dodecenal, (E)-2-tetradecenal, dodecanal, (E)-2-pentadecenal	Potter, T.L., 1996 [137]
	Linalol (69%), limoneno (2%), alcanfor (5%), acetato de geranilo (5%), γ -terpineno (5%)	Lamparsky, D. Klimes, I., 1988 [132]
	Linalol (49-77%), γ -terpineno (7-17%), acetato de geranilo (1-15%), alcanfor (3-12%), geraniol (2-5%), limoneno (1-4%), γ -terpineol (0-2%)	Halva, S. et al., 1986 [131]
	Linalol (41%), acetato de linalilo (21%), timol (7%), α -pineno (5%)	Gupta, G. K. et al., 1977 [127]
	γ -Terpineno (10%), linalol (65%), α -pineno (6%), p-cimeno (4%), alcanfor (5%)	Tashiken, J., Nykänen, L., 1975 [121]
	Linalol (69-29%), α -pineno (6%), limoneno (7%), γ -terpineno (5%)	Chou, J. S. T., 1974 [124]

En cuanto a sus usos, los aceites esenciales de orégano, romero y cilantro, además de ser empleados como aditivos para alimentos, poseen un amplio espectro de actividad antimicrobial *in vitro* e *in vivo*, atribuida principalmente a su contenido alto de derivados fenólicos [141-155]. En La **Tabla 2** se resumen algunos estudios sobre la actividad del AE de orégano contra varios microorganismos

Tabla 2. Actividad antimicrobial del aceite esencial de orégano.

ENSAYADO SOBRE	EFEECTO	REFERENCIA
<i>Cándida albicans</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Fungicida Antibacterial	Kazarinova, N. V. et al., 2002 [141]
<i>Culex pipiens molestus</i>	Tóxico	Traboulsi, A. F. et al., 2002 [146]
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Antibacterial	Horne, D. et al., 2001 [148]
<i>Acanthoscelides obtectus say</i>	Insecticida	Baricevic, D. et al., 2001 [150]
<i>Mosca Hessian mayetiola destructor say</i>	Tóxico	Lamiri, A. et. al., 2001 [152]
<i>Escherichia coli</i>	Tóxico	Skandamis, P., 2001 [153]
<i>Tribolium confusum</i> <i>Ephestia kuehniella</i>	Tóxico	Tunc, I., 2000 [154]
<i>Penicillium digitatum</i>	Tóxico	Daferera, D. J., 2000 [155]

La evaluación de la actividad antioxidante de los aceites esenciales de orégano, cilantro y romero se ha realizado en varios sistemas modelo usando diferentes sustratos, medios y técnicas analíticas de seguimiento [31-38]. En la **Tabla 3** se resumen algunos de estos estudios.

Tabla 3. Actividad antioxidante de los aceites esenciales de orégano, romero y cilantro.

SISTEMA MODELO	ACEITE ESENCIAL	PARÁMETROS EXPERIMENTALES	MEDICIÓN	EFFECTO OBSERVADO	REFERENCIA
Aceite de girasol Ácido linoleico	Cilantro Romero Orégano	-Calentamiento en presencia de oxígeno. -Presencia de oxígeno e iones de Fe^{2+} . -Atrapamiento de los radicales ABTS y DPPH	Aldehídos ABTS y DPPH	Inhibición	Puertas, M. A. et al., 2002 [63]
Yema de huevo	Orégano	-Atrapamiento de los radicales ABAP	TBARS	Inhibición	Ruberto, G. et al., 2002 [32]
Aceite de girasol Ácido linoleico	Cilantro Romero Orégano	-Incubación a 37°C con FeSO_4 -Calentamiento a 220°C en presencia de O_2 durante 2 horas	Hexanal	Inhibición	Stashenko, E. E. et al., 2002 [45]
Aceite de girasol	Romero Orégano	-Incubación a 37°C con FeSO_4 -Calentamiento a 220°C en presencia de O_2 durante 2 horas	Aldehídos	Inhibición	Salgar, W. 2002 [142]
Tejidos de pollo	Orégano	-Iones de Fe^{+2}	Malonaldehído	Inhibición	Botsoglou, N. A. et al., 2002 [33]
Aceite de girasol	Cilantro	-Incubación a 37°C con FeSO_4 -Calentamiento a 220°C en presencia de O_2 durante 2 horas	Aldehídos	Inhibición	Delgado, W., 2002 [42]
Aceite de girasol	Romero Cilantro	Irradiación con luz UV durante 24 horas	Hexanal	Inhibición	Contreras, N. 2002 [143]

Continuación de la **Tabla 3.**

Ácido linoleico	Romero	No se reportan	Ácido linoleico	Inhibición	Fadel, H. H. M., El-Massry, K. F., 2000 [35]
Manteca	Orégano	Calentamiento a 60°C	Valor de peróxido	Inhibición	Milos, M. et al., 2000 [34]
Aceite de girasol	Cilantro	Calentamiento a 215°C durante 2 horas	Ácidos grasos insaturados	Inhibición	Fuentes, H., 1999 [43]
Yema de huevo Hígado de rata	Laurel Salvia Orégano Romero Cilantro	Adición del radical dihidrocloruro 2,2'-azobis (2-amidinopropano) (ABAP)	TBARS	Inhibición	Baratta, M. T. et al., 1998 ^a , 1998 ^b [36,37]

Aunque la composición de los aceites esenciales ha sido ampliamente evaluada, pocos son los estudios realizados sobre la actividad antioxidante de los mismos y su posible mecanismo de acción, convirtiéndose ello en un campo que queda aún por explorar.

En los siguientes capítulos se presenta el estudio realizado sobre la actividad de los aceites esenciales de *Origanum vulgare* L., *Coriandrum sativum* L. y *Rosmarinus officinalis* L. en contra del deterioro oxidativo causado con radiación UVA-VIS a emulsiones de agua en aceite.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 REACTIVOS Y MATERIALES

Los reactivos y solventes empleados en este estudio fueron de grado HPLC o grado analítico y se adquirieron a través de los representantes de MALLINCKRODT, ALDRICH, MERCK y SIGMA. En la **Tabla 4** se reporta la lista de reactivos y solventes usados durante la realización de este proyecto.

Tabla 4. Lista de reactivos y solventes usados en el presente estudio.

Reactivos y solventes	Pureza y casa productora
Dodecil sulfato de sodio, SDS	> 99%, Merck-Schuchardt, 85662 Hohenbrum, Alemania
Butilhidroxianisol, BHA	> 98.5%, Merck-Schuchardt, 85662 Hohenbrum, Alemania
Pentafluorofenilhidracina, PFPH	97%, Aldrich Chemical Co., Milwaukee WI 53233, USA
Hexanal	98%, Aldrich Chemical Co., Milwaukee WI 53233, USA
Metanol	HPLC, Mallinckrodt, Phillipsburg, NJ 08865, USA
Hexano	HPLC, Mallinckrodt, Phillipsburg, NJ 08865, USA
Diclorometano	Grado analítico, Emscience, Merck KgaA, 41149122, Alemania
Sulfato de sodio anhidro	Grado analítico, Merck-Schuchardt, 85662 Hohenbrum, Alemania
Vitamina E	97%, Aldrich Chemical Co., Milwaukee WI 53233, USA
L(+)-ácido ascórbico	Grado analítico, Merck KgaA, 64271, Darmstadt, Alemania
Mezclas patrones de ésteres metílicos GLC 10, GLC 50, GLC 70, GLC 80 y GLC 100	Matreya, Inc., Pennsylvania, USA
Trifluoruro de boro al 20% en metanol, BF ₃ /CH ₃ OH	20%, Merck-Schuchardt, 85662 Hohenbrum, Alemania

Para la preparación de las muestras se utilizaron un *Minishaker* MS1 (2500 rpm, IKA, Works, INC, Wilmington, NC 28405, USA); un homogeneizador *Ultraturrax* (5000-25000 rpm, T8, CE, IKA, LABORTECHNIK STAUFEN, Alemania) y una centrífuga compacta II (*Clay Adams*® - Brand, Becton Dickinson & Co), como herramientas de extracción y mezclado. Las muestras de aceites, margarinas y material vegetal (cilantro, romero y orégano) empleadas se consiguieron en el mercado local. En la **Tabla 5** se indican algunas de las características encontradas en las etiquetas de las margarinas y los aceites vegetales usados.

Tabla 5. Margarinas y aceites vegetales empleados en este proyecto.

Margarina	Composición	Procedencia	Fabricante
Sabrina	N.e.	Bucaramanga	Santandereana de aceites S.A.
Mavesa	N.e.	Caracas	Mavesa S.A.
Natura	N.e.	Yumbo	Lloreda S.A.
Dagusto	N.e.	Bogotá	Acegrasas S.A.
Rama	N.e.	Cali	DISA S.A.
Premier	Girasol	Yumbo	Lloreda S.A.
Fina	Algodón, palma, palmiste y soya	Bogotá	Grasco S. A.
Aceites			
Gourmet	Girasol	Buga	Grasas, S.A.
Oleocali	Soya	Yumbo	Lloreda, S.A.
Palma	Palma	Bucaramanga	Muestra no comercial
Colavita <i>Olio di Oliva</i> 100% puro y natural (refinado)	Oliva	Italia	Oleifici Colavita, s.p.a.
Colavita <i>Olio di Oliva</i> calidad extra virgen (sin aditivos)	Oliva	Italia	Oleifici Colavita, s.p.a.

3.2 PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Los sustratos lipídicos utilizados para evaluar la actividad antioxidante *in vitro* de los aceites esenciales, la vitamina E y el ácido ascórbico, contra el deterioro oxidativo causado por la radiación UVA-VIS, fueron una emulsión preparada por la mezcla de agua en aceite, empleando como tensoactivo dodecilsulfato de sodio, SDS y una margarina comercial. El aceite vegetal y la margarina se escogieron entre varias muestras comerciales con base en su composición de ácidos grasos. Las mezclas entre los sustratos lipídicos y los posibles antioxidantes se realizaron como se describe a continuación:

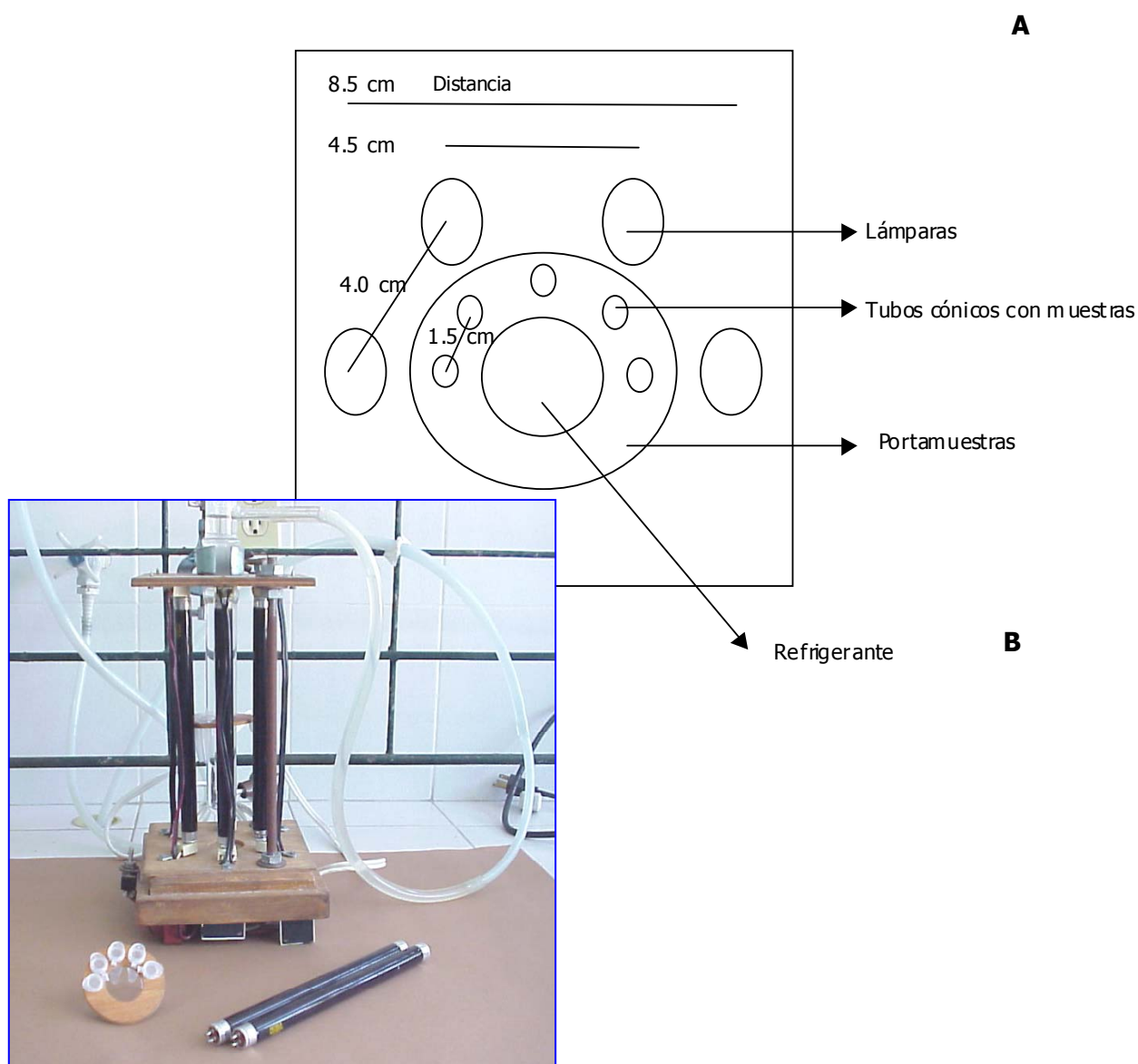
- ⊕ Margarina: los AE's, la vitamina E y el ácido ascórbico, AA, se mezclaron con margarina hasta obtener concentraciones de 1, 5, 10 y 20 g/kg, en 5 g de solución. Las soluciones así obtenidas se calentaron hasta fusión y se enfriaron, luego se mezclaron a 23000 rpm en un homogeneizador *Ultraturrax*, durante 1 minuto.
- ⊕ Emulsiones: se prepararon 5 g de emulsión de agua en aceite (relación 1:4) para cada concentración de antioxidante a evaluar, colocando la fase aceitosa sobre la acuosa y mezclando en el homogeneizador *Ultraturrax* durante 1 min a 23000 rpm. La fase acuosa se preparó por disolución de SDS al 7% (p/p), mientras que para la fase aceitosa los aceites esenciales y la vitamina E se mezclaron con aceite vegetal hasta obtener concentraciones de 1, 5, 10 y 20 g/kg. En el caso particular AA, éste se adicionó a la fase acuosa de tal modo que su concentración en la emulsión correspondió a 0.8, 4.0, 8.0 y 16.0 g/kg.

3.3. DETERIORO OXIDATIVO

Para estudiar el deterioro oxidativo de los sustratos lipídicos, que fueron preparados como se indicó en el Numeral 3.2, se depositaron (0.100 ± 0.01 g) en tubos cónicos de 1.5 mL de poli(propileno) (BRAND, Postfach 1155, D-97864 Wertheim, Alemania). Las muestras fueron dispuestas en la región intermedia entre el refrigerante y las 6 lámparas

fluorescentes F6T5BLB de 16*225.1 mm y 6 Watt, del reactor UV y se irradiaron durante 24 horas. El reactor UV "home-made" empleado en este trabajo, que se muestra en la **Figura 15**, fue diseñado y utilizado previamente en el trabajo de maestría titulado "Evaluación de la actividad antioxidante *in-vitro* de algunos aceites esenciales en el proceso de peroxidación lipídica inducida por la radiación ultravioleta", realizado por Contreras, N. (2002) [143].

Figura 15. A. Fotografía (vista general) del reactor UV "home-made". **B** Vista superior (esquema) del sistema para fotooxidación de las emulsiones de margarina y de SDS.



3.4 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

3.4.1 Análisis de ácidos grasos. El análisis de los ácidos grasos en los sustratos lipídicos se llevó a cabo mediante la obtención de sus ésteres metílicos y su cuantificación por cromatografía de gases de alta resolución con detector de ionización en llama (HRGC-FID), según las normas ISO 5509 ("*Animal and vegetable fats and oils-preparation of methyl ester of fatty acids*") y 5508 ("*Animal and vegetable fats and oils-Analysis by chromatography of methyl ester of fatty acids*"), respectivamente [156,157].

Se tomaron aproximadamente 50 mg de cada una de las muestras en tubos de ensayo con tapa rosca (16x50 mm). Luego, se les adicionaron 5 mL del complejo de trifluoruro de boro al 20% en metanol. Las mezclas se sumergieron en un baño de aceite con agitación magnética a una temperatura de $85 \pm 5^{\circ}\text{C}$, durante 1 hora, hasta observar la desaparición de la fase lipídica.

Posteriormente, las muestras fueron retiradas del baño de aceite y se dejaron reposar por 5 minutos. Seguidamente, se realizó la extracción de los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAME's) con 3 mL de n-hexano. De los extractos orgánicos obtenidos se separaron 0.5 mL y se aforaron a 1 mL con n-hexano. Se tomaron 2.0 μL de estas soluciones, para su respectivo análisis cromatográfico.

El análisis cromatográfico se realizó en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard (HP) 5890 A Series II (Palo Alto, California, USA), equipado con un inyector automático HP-7683. Como gas de arrastre se empleó helio (99.995%, AGA Fano S.A., Bucaramanga), con presión de entrada en la columna de 30 psi y velocidad lineal de 1.0 mL/min (100°C). Los flujos de aire e hidrógeno para el FID fueron 300 y 30 mL/min, respectivamente, como gas auxiliar se usó nitrógeno, con una velocidad de flujo de 30 mL/min. La inyección fue hecha en modo *split*, con flujo en la válvula *split* de 20 mL/min, (250°C) y un detector de ionización en llama (FID), cuya temperatura se mantuvo a 270°C . Los datos obtenidos en el análisis se procesaron a través del sistema de datos HP Chemstation Rev. A. 05. 01 [273]. Para la separación de los analitos de interés se empleó una columna DB-

WAX 60 m (L) x 0.25 mm (D.I) recubierta con fase estacionaria de poli(etilenglicol) de 0.25 μm (d_f) de espesor. La temperatura del horno se programó de 100°C (5 min) @ 2 °C/min hasta 136 °C (1 min) @ 7°C/min hasta 250°C (25 min).

Para la identificación de los FAME's presentes en las muestras se utilizó el método de comparación de sus tiempos de retención con los patrones de FAME's certificados (mezcla de estándares GLC-10, GLC-50, GLC-70, GLC-80, GLC-100, Matreya, Inc., Pennsylvania, USA), analizados bajo las mismas condiciones cromatográficas. En el **Anexo 2** se presenta el perfil cromatográfico característico para la mezcla patrón de FAME's.

El porcentaje relativo (%) de ácidos grasos se determinó según la norma ISO 5508 "*Animal and vegetable fats and oils-Analysis by chromatography of methyl ester of fatty acids*" [157].

3.4.2 Análisis del hexanal. El hexanal generado en las muestras irradiadas se extrajo en forma de su derivado hidrazónico PFPH-hexanal, generado en una reacción, cuyo esquema aparece en la **Figura 13**. Para la obtención y extracción de este derivado se adicionaron metanol (0.1 mL) y una solución de PFPH (4000 ppm) en hexano (1 mL). Después de agitar durante 1 min a 2500 rpm, la mezcla se centrifugó durante 5 min. De la fase orgánica se extrajeron 900 μL , los cuales se evaporaron hasta 250 μL . Sobre este residuo se adicionó metanol (1 mL), con el objeto de extraer el derivado formado y precipitar la grasa presente en el extracto. Una vez más se centrifugó la mezcla, y del líquido sobrenadante se extrajeron 900 μL , de los cuales se inyectó 1.0 μL al cromatógrafo, para su respectivo análisis.

El análisis del derivado PFPH-hexanal se realizó en un cromatógrafo de gases HP 6890 *PLUS* con control electrónico de presión, dotado de un microdetector de captura de electrones ($\mu\text{-ECD}$, ^{63}Ni), un inyector automático HP 7683, un puerto de inyección *split/splitless* y un sistema de datos HP Chemstation HP Rev. A. 06.03 [509]. Se empleó una columna HP-5, 50 m (L) x 0.2 mm (D.I.) x 0.33 μm (d_f), recubierta con 5%-fenilpoli(metilsiloxano). La temperatura del inyector y detector permanecieron a 250 y

280°C, respectivamente. La temperatura de la columna se programó desde 100°C (5 min) @ 10°C/min hasta 250°C (2 min). Se utilizó helio como gas de arrastre (99.995%, Aga Fano S.A., Bucaramanga), con flujo en la columna de 1.0 mL/min (70°C), relación *split* 10:1 y como gas auxiliar en el μ -ECD se empleó la mezcla de argón/metano (9:1), con flujo de 20 mL/min.

La identificación del derivado hidrazónico PFPH-hexanal se realizó por comparación entre los cromatogramas de las muestras irradiadas y el patrón PFPH-hexanal, así como se llevó a cabo en los trabajos de Contreras, N. (2002) [143], Puertas, M. A. (2002) [63], y Salgar, W. (2002) [142].

3.4.3 Análisis de aceites esenciales. Los aceites esenciales se obtuvieron por medio de la técnica de hidrodestilación (HD). En este procedimiento el material vegetal (aproximadamente 2 kg), finamente picado, se colocó en un balón de destilación de dos bocas con una capacidad de 6 L. Posteriormente, se adicionó agua destilada (500 mL) y el sistema se calentó hasta ebullición durante tres horas. Durante este tiempo los componentes volátiles se condensaron en un refrigerante FISHER SCIENTIFIC (Isotemp, Refrigerated Circulator Model 901). Los AE's obtenidos por decantación se conservaron en frascos ámbar bajo refrigeración (+4°C).

Para la identificación de los componentes presentes en los AE's se utilizó un cromatógrafo de gases de alta resolución *Agilent Technologies* modelo 6890 *Series PLUS*, acoplado a un detector selectivo de masas (MSD) *Agilent Technologies* 5973 *Network*, con sistema de datos HP MS *ChemStation* 61701AA, equipado con base de datos de espectros de masas NBS75K y Wiley 138K. Se empleó una columna capilar DB-1 (J & W Scientific, Folsom, CA, USA) de 60 m (L) x 0.25 mm (D.I.), de sílice fundida con fase estacionaria apolar de 100% poli(dimetilsiloxano) de 0.25 μ m (d_f), entrecruzada e inmovilizada sobre la pared del capilar.

La temperatura del horno se programó de 40°C (10 min) @ 3°C/min hasta 250°C/min (30 min). Como gas de arrastre se empleó helio (99.995%, AGA Fano S.A.), con la presión de

entrada en la cabeza de la columna de 200 kPa y velocidad lineal de 37 cm s⁻¹. El volumen de inyección fue de 1 µL de muestra en el modo *split*, con una relación *split* 30:1. Para ello, se empleó un inyector automático *Agilent Technologies*, modelo 7683 *Series injector*.

Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia fueron 230 y 285°C, respectivamente. La energía de los electrones bombardeantes fue 70 eV. La corriente iónica total reconstruida (TIC) y los espectros de masas se obtuvieron por medio de barrido automático de radiofrecuencias a 4.1 scan/seg en el rango de masas de *m/z* 40-400 Dalton, con analizador cuadrupolar operando en el modo de barrido completo, *full scan*.

3.5. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La actividad antioxidante de los AE's, la vitamina E y el AA se evaluó al estudiar el deterioro oxidativo, causado por la radiación UV, a los sustratos lipídicos con y sin antioxidante. Al sustrato lipídico (sistema modelo), sin antioxidante, se le denominó "Blanco". El deterioro oxidativo se evaluó, determinando la concentración del ácido linoleico (su disminución) y la generación del hexanal (aumento de la concentración). Las ecuaciones utilizadas para los cálculos de la AA, usando el ácido linoleico (%AA_{Linoleico}) y el hexanal (%AA_{Hexanal}), fueron las siguientes:

$$\%AA_{\text{Linoleico}} = \frac{[C_B - C_M]}{[C_{BB} - C_B]} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

$$\%AA_{\text{Hexanal}} = \frac{[A_B - A_M]}{A_B} \times 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

C_B: Concentración del ácido linoleico en el "blanco" irradiado (mg ácido linoleico/100 mg de aceite);

C_{BB} : Concentración del ácido linoleico en el "blanco" sin irradiar (mg/100 mg de aceite);

C_M : Concentración del ácido linoleico en la muestra con adición del antioxidante (mg/100 mg de aceite);

AA_B : Área del pico cromatográfico del hexanal en el "blanco";

AA_M : Área del pico cromatográfico del hexanal en la muestra.

Una vez obtenidos estos valores (Ecuaciones 1 y 2), se estableció la relación, k , que existía entre las actividades de los aceites esenciales estudiados y el ácido ascórbico ($\%AA_{sustancia}$) con respecto a la de la vitamina E ($\%AA_{vitaminaE}$), calculada para cada valor de concentración, así:

$$k = \frac{\%AA_{sustancia}}{\%AA_{vitaminaE}} \quad \textbf{Ecuación 3}$$

Las siguientes fueron las ecuaciones empleadas para el cálculo de los valores promedio ($\bar{X}$), las desviaciones estándar (s) y los coeficientes de variación (CV, %) de parámetros obtenidos experimentalmente:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad s = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{(n-1)}} \quad \%CV = \frac{s}{\bar{X}} \times 100$$

$\bar{X}$ = valor promedio de la variable X ;

X_i = valor "iésimo" obtenido para la variable X en una medición;

n = número de mediciones;

s = desviación estándar;

$\% CV$ = coeficiente de variación;

3.6 ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE DOS POSIBLES ANTIOXIDANTES

Para evaluar la interacción entre el AE de orégano y los antioxidantes sintéticos (vitamina E y AC) se prepararon mezclas de cada uno de ellos en la margarina “Sabrina” de la forma descrita en el Numeral 3.2 según las concentraciones indicadas en la **Tabla 6**. La AA de cada una de estas mezclas se evaluó a través de la cuantificación del hexanal generado, para lo que se utilizó la **Ecuación 2**.

Tabla 6. Cantidades utilizadas en g/kg para evaluar la interacción entre el aceite esencial de orégano, la vitamina E y el AC en la margarina “Sabrina”.

Concentración del AE de orégano, la vitamina E y el AA, g/kg			Nombre de las mezclas
AE	Vitamina E	AC	
10	10	0	10EO
10	5	0	5EO
10	0	10	10AO
10	0	5	5AO
10	0	0	10O
0	10	0	10E
0	0	10	10A
0	5	0	5E
0	0	5	5A

EO: mezcla entre vitamina E y el aceite esencial de orégano; AO: mezcla entre el ácido ascórbico y el aceite esencial de orégano; O: aceite esencial de orégano; E: vitamina E y A: ácido ascórbico

3.7. EVALUACIÓN DE TRES FRACCIONES DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO

Se obtuvieron tres fracciones a partir de la elución del aceite esencial de orégano (1.5 mL) por cromatografía en columna sobre gel de sílice con los solventes pentano, benceno y éter [158]. Las fracciones así obtenidas se mezclaron con margarina en una concentración de 10.0 g/kg, para determinar su AA contra el deterioro oxidativo causado por la radiación UVA-VIS, a través de la determinación cuantitativa del hexanal.

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

La identificación de los componentes de los AE's, extraídos por HD se llevó a cabo por comparación de los espectros de masas de cada pico cromatográfico con los de las bibliotecas Wiley 138 y NBS75K del software HP MS ChemStation. La identificación obtenida se indica en la **Tabla 7** y en el **Anexo 1** aparecen las corrientes iónicas totales (TIC) de los aceites esenciales obtenidas por HRGC-MSD.

Tabla 7. Composición de los aceites esenciales obtenidos por HD.

Planta	Compuesto identificado	Área normalizada (%)
<i>Coriandrum sativum</i> L.	Octano	0.2
	(E)-3-Hexen-1-ol	0.1
	Nonano	3.4
	α -Pino	0.1
	Decano	0.4
	Octanal	1.1
	Decanal	12.9
	(E)-2-Decenal	8.5
	1-Decanol	15.2
	Undecanal	3.9
	Undecanol	2.2
	Tetradecanal	0.9
	Ácido linoleico	0.2
	Fitol	0.9
<i>Origanum vulgare</i> L.	1-Octen-3-ol	0.9
	β -Mirreno	1.3
	α -Felandreno	0.4
	p-Cimeno	10.0
	Limoneno	0.6
	Timol	0.6
	Carvacrol	51.4
	β -Cariofileno	6.4
	α -Bergamoteno	3.1
	Óxido de cariofileno	1.0

Continuación de la **Tabla 7**.

<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	α -Pino	10.4
	Canfeno	7.6
	β -Pino	5.1
	3-Octanona	2.1
	β -Mirreno	2.3
	3-Octanol	0.3
	α -Felandreno	1.1
	p-Cimeno	1.2
	Limoneno	3.1
	Eucaliptol	15.9
	Linalol	1.0
	Alcanfor	28.7
	Borneol	3.8
	Verbenona	3.0
	Acetato de bornilo	2.8
	β -Cariofileno	0.4
	β -Bisaboleno	0.5
	Óxido de cariofileno	0.3

Como se puede observar en la **Tabla 7**, en el AE de orégano, obtenido por HD con el rendimiento de 0.6%, los siguientes fueron compuestos mayoritarios: carvacrol (51.4%), p-cimeno (10.0%), β -cariofileno (6.4%) y α -bergamoteno (3.1%). Estos compuestos también fueron encontrados en los AE's de orégano, estudiados por Puertas, M. A. et al. (2002) [63], D'Antuono, L. F. et al. (2000) [118], Scheffer, J. J. C. et al. (1986) [140], Maarse, H. (1973) [123] y Salgar, W. (2002) [142].

En el AE de cilantro, obtenido con el rendimiento de 0.1%, se encontraron como compuestos mayoritarios los siguientes: n-decanol (15.2%), decanal (12.9%), (E)-2-decenal (8.5%), undecanal (3.9%) y nonano (3.4%). Esta composición fue similar a la reportada por Contreras, N. (2002) [143], Delgado, W. A. (2002) [42] y Potter, T.L. (1996) [137]. A pesar de las similitudes halladas, varios de los estudios realizados sobre esta planta revelan, que el linalol es el componente principal de la mayoría de los AE's obtenidos de cilantro [42,63,121,124,131,132]. Con respecto a esto último, Lassanyi, et al. (1967, 1970) [133,134], explicó que las diferencias encontradas en la composición del aceite de cilantro se debían a la edad y la fisiología de la planta, los cuales influían sobre la cantidad y la ubicación de los compuestos en sus tejidos.

Para el AE de romero empleado en este estudio, se determinó un rendimiento de 0.7%. Los siguientes fueron compuestos mayoritarios: alcanfor (28.7%), eucaliptol (15.9%), α -pineno (10.4%), canfeno (7.6%) y β -pineno (5.1%). Los mismos compuestos también fueron reportados en los estudios realizados por Puertas, M. A. et al. (2002) [63], Contreras, N. (2002) [143], Salgar, W. (2002) [142], Fournier, G. et al. (1989) [139], Rosua, J. L. García-Granados, A. (1987) [138], Boelens, M. H. (1985) [130], Rhyu, H. Y. (1979) [129] y Skrubis, B. G. (1972) [125], entre otros.

En general, las variables que inciden sobre la composición y rendimiento de un AE fundamentalmente son las siguientes: condiciones agroecológicas y parámetros operacionales del proceso de extracción. Las variaciones en las condiciones agroecológicas inducen cambios morfológicos, histológicos y fisiológicos en la planta; mientras que la eficiencia de la HD está relacionada con los parámetros operacionales utilizados, tales como tiempo, temperatura y cantidad de agua [96,111,113-118,136].

4.2. CONDICIONES DEL DETERIORO OXIDATIVO

Para evaluar la AA de los AE's, la vitamina E y el AC, se utilizó un sistema modelo en donde el DO del sustrato (margarina y emulsión de SDS) fue acelerado con radiación UVA-VIS, de tal modo, que la respuesta antioxidante se determinó en tiempos más cortos en relación con los tiempos requeridos para los procesos de deterioro por autooxidación. A continuación, se describen las características de los sustratos lipídicos, la radiación emitida por las lámparas y su efecto sobre la oxidación de las muestras.

⊕ Sustrato modelo: después de analizar los perfiles cromatográficos de ácidos grasos de varias muestras de margarinas y aceites vegetales, obtenidas en el comercio, y teniendo en cuenta factores como precio y contenido de ácido linoleico, se escogieron como sustratos modelo la margarina "Sabrina" (MS) y el aceite vegetal "Gourmet" (AG), los cuales según los datos adjuntos en los **Anexos 2 y 3**, poseen el ácido linoleico en concentraciones de 12.3 y 59.2%, respectivamente. Las muestras

obtenidas en el mercado local pueden presentar variaciones en el contenido de ácidos grasos debido a las clases y cantidades de aceites vegetales utilizados en su fabricación.

- ⊕ Radiación emitida por las lámparas: la caracterización de las longitudes de onda emitidas por las lámparas se realizó a través de la exposición de una película Timax 100 durante 3 minutos a la radiación emitida. Para ello, la película se colocó en un espectrógrafo Jarrell-Ash, tipo Ebert con 3.4 m de longitud de distancia focal. La asignación de los valores de longitudes de onda encontrados, se realizó por comparación de las líneas emitidas con el espectro de líneas de hierro y de la lámpara de mercurio. En la **Tabla 8** se indican los resultados obtenidos en esta caracterización.

Tabla 8. Longitudes de onda emitidas por las lámparas fluorescentes en el fotoreactor “home-made”, usado en el presente estudio.

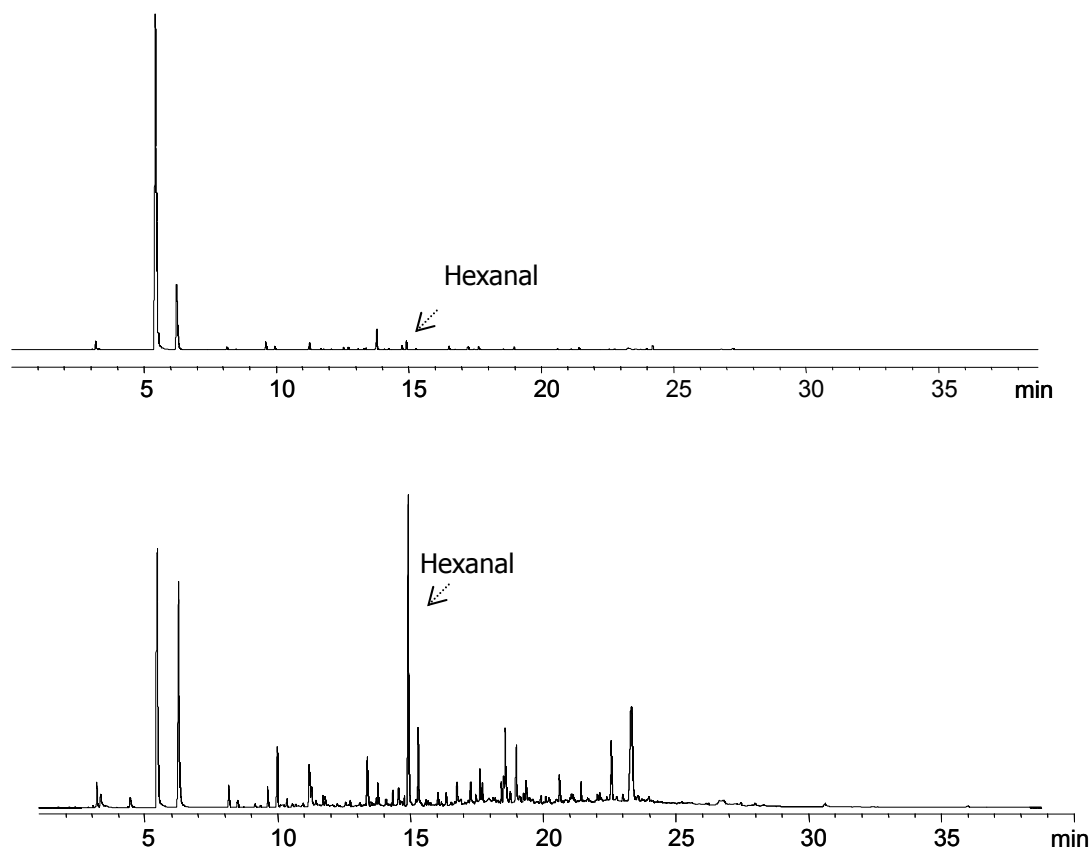
Característica	Longitudes de onda (nm)						
Líneas	334.14	365.0	365.48	366.30	404.63	407.783	435.833
Continuo	360.0-380.0						

Según SIES, H. (1991) [18], para efectos de estudios biológicos, la radiación UV se divide en tres regiones, denominadas UVC (190-290 nm), UVB (290-320 nm) y UVA (320-380 nm). Las longitudes de onda para las lámparas utilizadas en este estudio correspondieron a las regiones UVA y visible cercano. Sobre la radiación UVA se conoce, que causa daños en el DNA, alteraciones en las membranas lipídicas, daños en la piel e inactivación de enzimas, microorganismos y células mamarias; esta radiación es una de las principales causantes del estrés oxidativo. Los antioxidantes, a través de diferentes mecanismos, hacen parte de la defensa celular contra el daño causado por este tipo de radiación [18].

- ⊕ Irradiación de las muestras: para establecer la influencia de la radiación UVA-VIS sobre el deterioro oxidativo observado en los sustratos lipídicos, la MS y la emulsión de agua en aceite con SDS fueron colocadas en el reactor UV con o sin protección contra la radiación, i. e. con y sin papel aluminio protector. Los resultados obtenidos en este

ensayo, que se resumen en el **Anexo 4** y la **Figura 16**, muestran que la radiación emitida por las lámparas causa el notorio deterioro de los sustratos después de su exposición durante 24 horas, mientras que con el solo calentamiento por las lámparas, se produce una cantidad del hexanal mucho más baja.

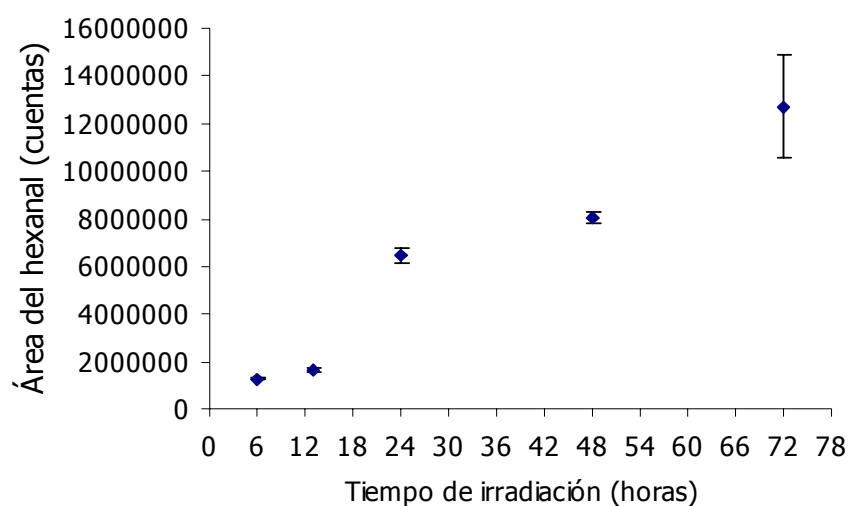
Figura 16. Perfiles cromatográficos obtenidos por HRGC- μ ECD, de productos secundarios finales de margarina "Sabrina" irradiada: **A.** Con papel aluminio. **B.** Sin papel aluminio. Los aldehídos fueron derivados con PFPH [40,141].



Según la literatura es probable que el deterioro de los lípidos con radiación UVA-VIS ocurra a través de sustancias fotosensibilizadoras, las cuales pueden estar presentes en productos comerciales. Los fotosensibilizadores absorben este tipo de radiación y luego transfieren la energía a los otros compuestos presentes en el medio de reacción a través de los mecanismos descritos en el Numeral 2.1.2. [3,18,78-80]. Por otro lado, se considera poco probable la acción directa de la radiación sobre los sustratos lipídicos porque los lípidos insaturados no conjugados no absorben radiación UVA-VIS. Solamente

cuando están presentes pequeñas proporciones de hidroperóxidos lipídicos, productos en un proceso previo de autooxidación, o cuando se aumenta la intensidad y tiempo de irradiación, ocurre el deterioro oxidativo por acción directa de la radiación [18,143]. Esto último se ilustra también en las **Figuras 17 y 18**, donde se nota el efecto del tiempo de irradiación sobre la margarina “Sabrina”, al realizar el seguimiento de la degradación del ácido linoleico y la generación del hexanal.

Figura 17. Generación del hexanal en margarina “Sabrina” irradiada durante varias horas.



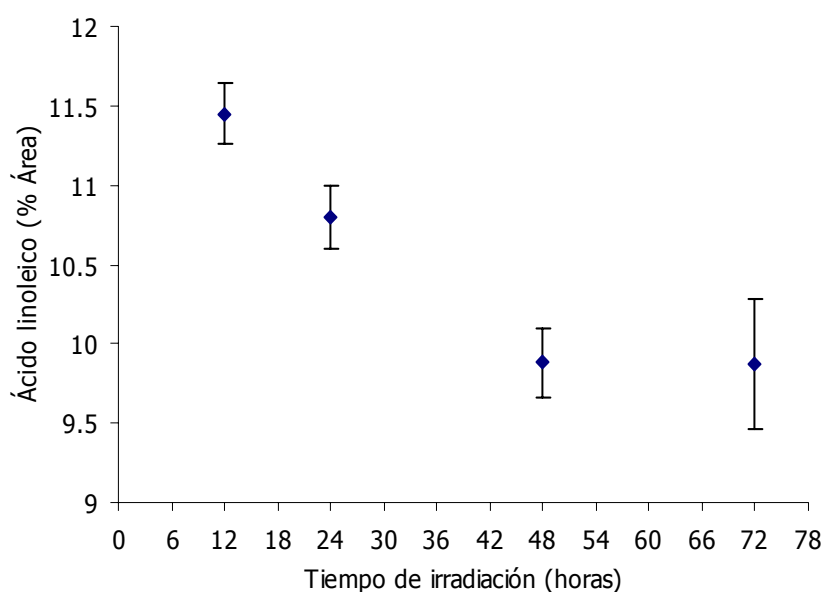
Horas de irradiación	Área de hexanal (cuentas)		
	$\bar{X}^1$	s	CV, %
6	1295290	53740	4
13	1684416	85028	5
24	6459086	337474	5
48	8028468	256566	3
72	12720858	2179980	17

¹ Promedio de tres mediciones de áreas del pico cromatográfico del hexanal

La variación del contenido del ácido linoleico y del hexanal, observada en las **Figuras 17 y 18**, es aproximadamente proporcional al tiempo de irradiación. La cantidad del hexanal generado en la margarina “Sabrina” durante las primeras 13 horas es poca, pero aumenta

considerablemente durante las siguientes 13 y 24 horas, tiempo después del cual permanece casi invariable. La desviación estándar alta (para 72 horas de irradiación) se observó tanto en la medición del hexanal, como del ácido linoleico, y aunque no se aclaró su origen, se podría pensar que es debido a fluctuaciones de la energía emitida por las diferentes lámparas durante el tiempo tan prolongado de irradiación. La variación baja observada en la concentración del ácido linoleico y hexanal al inicio del periodo de irradiación (6-13 horas), se debe al fenómeno conocido en la literatura como “periodo de inducción”. Éste es el tiempo requerido para que los ácidos grasos susceptibles al DO se conviertan en hidroperóxidos, los cuales, una vez formados con la ayuda de radiación, calor y/o iones metálicos, se descomponen con la producción de sustancias volátiles [64].

Figura 18. Degradación del ácido linoleico en margarina “Sabrina” irradiada durante varias horas.



Horas de irradiación	Área relativa de ácido linoleico (%)		
	$\bar{X}^1$	s	CV, %
12	11.45	0.19	1.66
24	10.80	0.20	1.85
48	9.88	0.22	2.23
72	9.87	0.41	4.15

¹ Promedio de tres mediciones de la concentración del ácido linoleico (mg/100 mg de margarina)

En la **Figura 18** se observa que el DO produjo cambios leves en la cantidad del ácido linoleico, lo cual coincide con lo reportado por Pokorny, J. et al. [3]. Debido a estos pequeños cambios, la evaluación del deterioro de este sustrato debe realizarse cuidadosamente. Ante todas estas dificultades, los investigadores prefieren la utilización de otros métodos que permitan detectar mayores cambios en la cantidad de sustrato analizado.

Los resultados obtenidos en cuanto a la variación del ácido linoleico y hexanal después de varias horas de irradiación del sustrato con radiación UVA-VIS, permitieron escoger para los siguientes experimentos como tiempo de irradiación 24 horas, puesto que durante este período el DO causado a la margarina es notorio y reproducible, para realizar las pruebas de la actividad antioxidante de los AE's y las sustancias sintéticas a evaluar.

4.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

El seguimiento del deterioro oxidativo, ocasionado por la radiación UVA-VIS, sobre la margarina permitió la evaluación de la actividad antioxidante de las sustancias de origen natural (AE's) y sintético (vitamina E y AC) a través de la cuantificación del hexanal generado; los resultados obtenidos en estos ensayos se reportan en la **Tabla 9**.

Los AE's de cilantro, orégano y romero, la vitamina E y el ácido ascórbico exhibieron efecto protector antioxidante durante la oxidación de la MS, acelerada por la radiación UVA-VIS. Entre los AE's el de orégano fue el que presentó mayor protección, seguido por los de cilantro y romero. Además, se observó que la acción antioxidante de los AE's de orégano y cilantro aumentaba proporcionalmente con su concentración en la emulsión (margarina). Los resultados reportados en la literatura sobre la AA de los AE's de cilantro, romero y orégano en otros sistemas modelo, presentados en la **Tabla 3** [31-33, 42, 43, 143], coincidieron con los nuestros y mostraron, que estos AE's efectivamente inhiben el DO acelerado. Sin embargo, estudios realizados por Puertas, M. (2002) [63], indicaron que el AE de cilantro en una concentración de 20 g/kg mostró actividad pro-oxidante en el aceite vegetal de girasol, lo cual fue explicado con base en la concentración alta de alcoholes presentes en este aceite esencial.

Tabla 9. Actividad antioxidante de los aceites esenciales de cilantro, romero y orégano, la vitamina E y el ácido ascórbico en la margarina "Sabrina" durante el deterioro oxidativo acelerado con radiación UVA-VIS.

Sustancia evaluada	Cantidad, g/kg											
	1			5			10			20		
	$\bar{X}^1$	s	CV%	$\bar{X}^1$	s	CV%	$\bar{X}^1$	s	CV%	$\bar{X}^1$	s	CV%
AE de orégano	35	2.4	6.8	71	8.3	12	91	5.1	5.6	95	0.8	0.9
AE de cilantro	ND			28	4.6	16	42	6.0	14	61	0.6	1.0
AE de romero	ND			20	5.3	26	20	1.5	7.9	ND		
Ácido ascórbico	ND			13	2.2	17	43	3.2	7.5	71	6.7	9.4
Vitamina E	17	2.1	12	77	8.1	10	68	10	15	68	3.7	5.5

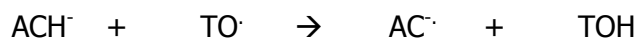
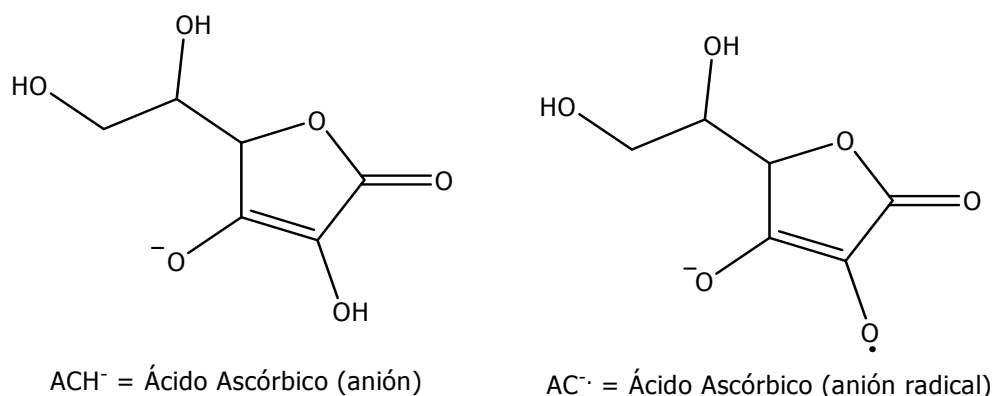
¹ Promedio de tres mediciones de área del pico cromatográfico del hexanal

ND = no determinado

En cuanto al modo de acción de las sustancias antioxidantes evaluadas en este trabajo, se conoce, por ejemplo, que los tocoferoles actúan a través de mecanismos de ruptura de cadena atrapando radicales alquilo, alcoxilo y peroxilo y originan, a su vez, especies radicalarias antioxidantes estables y poco reactivas, que son estabilizadas por resonancia ($\text{TO}^\cdot$). Por otro lado, la disminución de la actividad antioxidante de los tocoferoles se debe a que los radicales tocoferoxilo generados ($\text{TO}^\cdot$) pueden ocasionar el deterioro de los ácidos grasos, induciendo la reducción de los metales presentes en el medio; éstos últimos son más activos en la descomposición homolítica de hidroperóxidos hasta radicales alcoxilo, los cuales también pueden promover las reacciones en cadena [77].

El ácido ascórbico actúa como antioxidante de ruptura de cadena, “barredor” de especies reactivas de oxígeno y quelador de iones metálicos; además tiene la habilidad de interactuar sinérgicamente con el radical $\text{TO}^\cdot$, reduciéndolo, como se muestra en la **Figura 19** [1,77]. Cuando el anión radical del ácido ascórbico ($\text{AC}^\cdot$) se encuentra en un sistema *in vivo* es reducido por los sistemas enzimáticos NADP o NADPH. Además de las propiedades antioxidantes, se conoce que el AC puede actuar como pro-oxidante en la presencia de iones metálicos y en altas concentraciones de ascorbato (ACH^-)

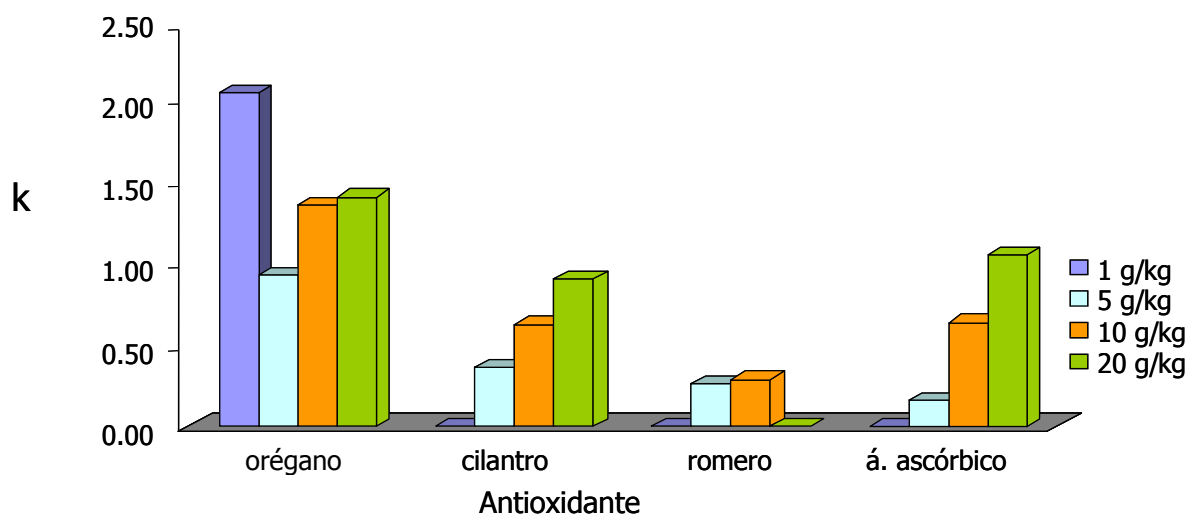
Figura 19. Estructura del ácido ascórbico y su reacción con el radical tocoferoxilo.



En cuanto a los AE's que son mezclas multicomponentes, el mecanismo de su acción antioxidante no se conoce con certeza; sin embargo, varios autores, han mostrado que algunos AE's y sus fitoconstituyentes poseen la capacidad de atrapamiento de los radicales ABTS $\cdot$ y DPPH $\cdot$ igual o superior a la de antioxidantes sintéticos como la vitamina E, el Trolox y el ácido ascórbico [31, 38, 159, 160]. WILLIAMS, W. B. et al. (1995) [160] presentaron un esquema de reacción en donde el eugenol (fitoconstituyente de varios AE's) atrapa el radical DPPH $\cdot$ de manera similar a la vitamina E; mientras que Puertas, M. et al. (2002) [31], mostraron que los AE's de orégano y romero poseen una mayor capacidad para el atrapamiento del radical ABTS $\cdot$, que el AE de cilantro.

La relación k (Véase **Ecuación 3**), entre la AA de los AE's y el AC, con respecto a la AA de la vitamina E evaluada en la emulsión MS, se calculó para cada valor de concentración. La AA del AE de orégano para una concentración de 1 g/kg fue relacionada con la AA de la vitamina E en igual concentración. De la misma forma, se calcularon los valores de la relación k para todas las otras concentraciones del AE. Los resultados obtenidos de estas relaciones se muestran en la **Figura 20**, a partir de la cual se puede determinar que el AC y los AE's de cilantro y romero presentan menor AA que la vitamina E para todos los valores de concentración evaluados, mientras que el AE de orégano empleado brinda una protección mayor o igual a la de la vitamina E contra el DO acelerado por la radiación UVA-VIS.

Figura 20. Actividades antioxidantes *in vitro* de los AE's y el ácido ascórbico con respecto a la actividad antioxidante de la vitamina E. $k = AA\%_{\text{sustancia}} / AA\%_{\text{vitamina E}}$.

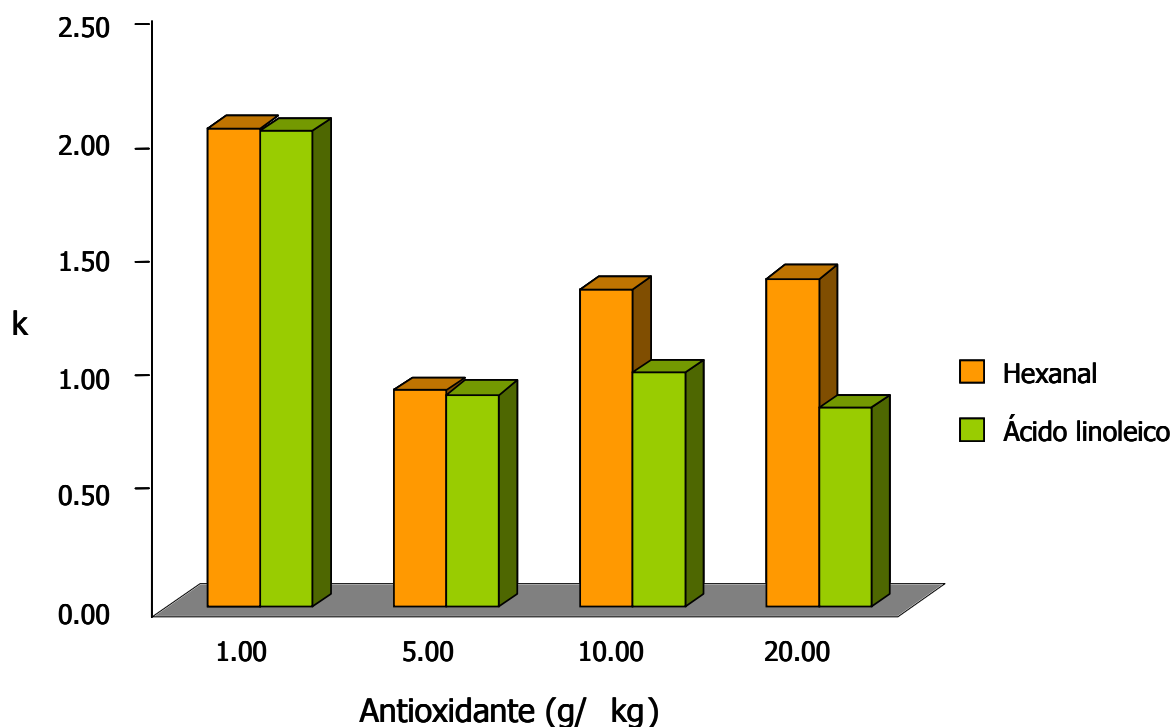


La mayor AA que muestra el AE de orégano en relación al de cilantro, el romero y el AC, se debe, probablemente, a la presencia de los compuestos fenólicos, carvacrol y timol (52%). Estudios realizados por PUERTAS, M. et al. (2002) [31], indicaron que aquellas fracciones del AE de orégano, obtenidas por cromatografía en contracorriente multilaminar (*Multilayer Coil Countercurrent Chromatography- MLCCC*), que contenían carvacrol y timol, presentaron capacidad de atrapamiento de los radicales ABTS· Y DPPH· mucho más alta.

Después de realizar los anteriores ensayos para cada una de las sustancias antioxidantes, se evaluó el efecto de la técnica analítica de medición de la AA del AE de orégano en la MS. Para tal efecto, se determinaron la disminución del ácido linoleico, utilizando la técnica HRGC-FID, y la generación del hexanal, empleando HRGC- μ ECD. Los resultados obtenidos en estas pruebas, que se observan en la **Figura 21** y la **Tabla 10** indican que la actividad del aceite esencial de orégano, con respecto a la de la vitamina E (relación k), tiene valores similares cuando se evalúa la degradación del ácido linoleico o la generación del hexanal, para valores de concentración de 1 a 5 g/kg de antioxidante, mientras que para las concentraciones de 10 a 20 g/kg las actividades obtenidas por medio de estas dos técnicas son diferentes. Además, los valores absolutos de las actividades antioxidantes, reportados en la **Tabla 10**, muestran que existen diferencias en resultados obtenidos por dos métodos analíticos utilizados. Para establecer, si los efectos protectores determinados para 1 g/kg diferían significativamente, se calculó el t de *student* para mediciones por triplicado, obteniéndose un valor de 3.38. Este valor se comparó con su valor crítico para 4 grados de libertad y una probabilidad del 95% (2.776). De este modo, se estableció que la diferencia obtenida en el efecto protector para este valor de concentración fue significativa y no se debió simplemente a un error aleatorio. De acuerdo con esto, las diferencias observadas en los valores de AA, pueden ser atribuidas a errores sistemáticos de tipo personal, metodológico e instrumental, dentro de los cuales están involucrados parámetros, tales como preparación de mezclas, repetibilidad del DO, extracción del analito de interés (hexanal o ácido linoleico) y sensibilidad del sistema de detección utilizado. Los errores cometidos en los tres primeros parámetros fueron reducidos por la utilización de la misma mezcla de reacción durante los diferentes DO, junto con la utilización de muestras "blanco", las cuales se sometieron al mismo proceso de extracción

y deterioro de la mezcla con antioxidante; de tal modo, se espera que sobre los valores observados de AA influya en mayor proporción la sensibilidad del sistema de detección utilizado.

Figura 21. Actividad antioxidante del AE de orégano evaluada por medio de la cuantificación del hexanal y del ácido linoleico. Donde, $k = AA\%_{\text{sustancia}} / AA\%_{\text{vitaminaE}}$



Seguidamente, se realizó la determinación de la AA del AE de orégano en la emulsión MS y en la emulsión con SDS, ESDS, por medio de la cuantificación del hexanal generado. Los resultados obtenidos en estas pruebas, que se observan en la **Figura 22** y en la **Tabla 11**, indican que este aceite esencial protege tanto a la MS, como a la ESDS, contra el DO, causado por la radiación UVA-VIS. La respuesta obtenida para sustratos con el mismo valor de concentración de AE de orégano, presenta diferencias notorias; así, por ejemplo, para un contenido de aceite esencial de 10 g/kg se determinaron actividades antioxidantes de 40 ± 3.4 y 91 ± 5.1 en la ESDS y la MS, respectivamente. Estas

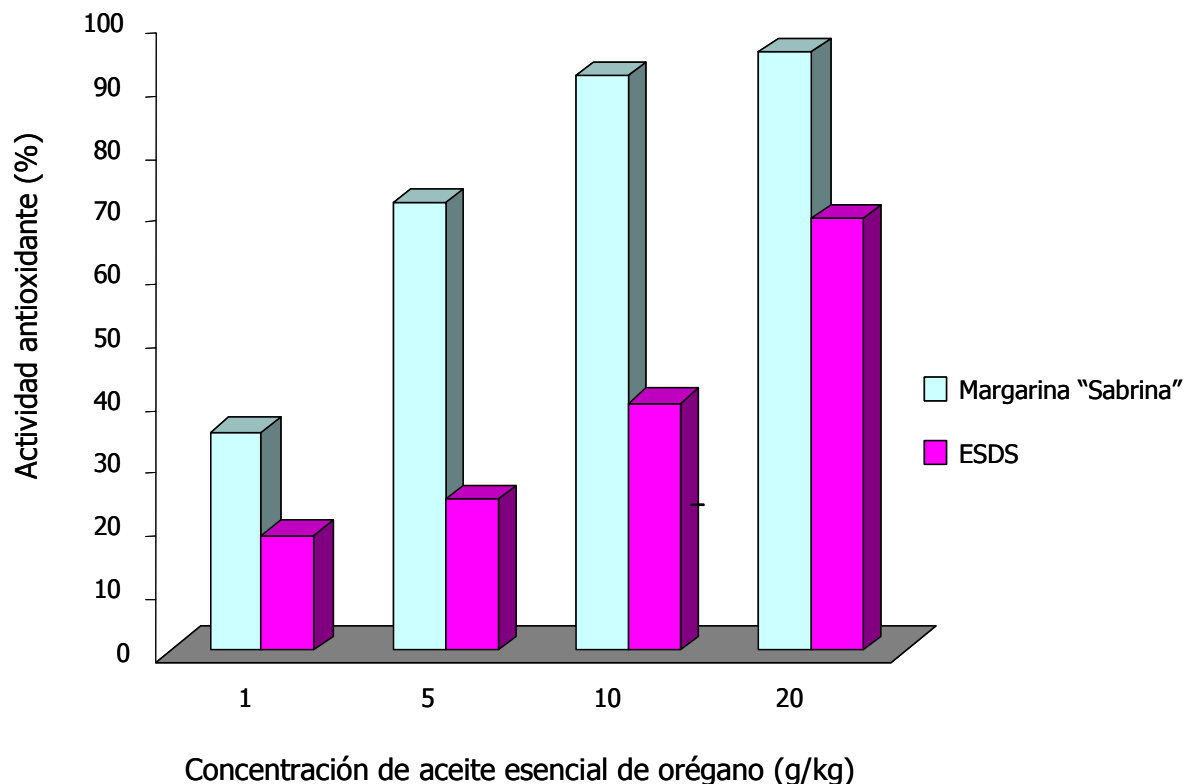
variaciones han sido explicadas en varios artículos científicos. Así por ejemplo, los estudios realizados por Decker, E. A. (2000), entre otros [46-55], muestran la variación de la actividad antioxidante entre emulsiones (de aceite en agua) y aceites (*bulk*). En el caso de emulsiones de agua en aceite, a las cuales corresponden los sustratos utilizados en este estudio, se prevé que los antioxidantes tendrán un comportamiento similar al encontrado en los aceites, lo cual es evidenciado al comparar los resultados obtenidos aquí con los reportados por FUENTES, H. [43], CONTRERAS, N. [143], SALGAR, W. [142], DELGADO, W. [42] y PUERTAS, M. [63], Las variaciones encontradas al realizar esta comparación se deben, entre otros factores, a diferentes fuentes y procedimientos para acelerar la oxidación, lo cual no sólo puede cambiar el mecanismo de oxidación, sino la manera de acción de los antioxidantes [97,77].

Tabla 10. Actividad antioxidante del aceite esencial de orégano, determinada por medio de dos métodos analíticos en la margarina "Sabrina".

Nombre	Determinación del hexanal*			
	Cantidad, g/kg			
	1	5	10	20
AE de orégano	35 ± 2.4	71 ± 17	91 ± 5.1	95 ± 0.8
Vitamina E	17 ± 2.1	77 ± 8.1	68 ± 10	68 ± 3.7
k	2.0	0.9	1.4	1.4
Nombre	Determinación del ácido linoleico*			
	Cantidad, g/kg			
	1	5	10	20
AE de orégano	28 ± 2.3	41 ± 4.9	84 ± 6.4	69 ± 3.0
Vitamina E	14 ± 2.1	46 ± 5.5	84 ± 1.0	82 ± 3.7
k	2.0	0.9	1.0	0.9

*Promedio de tres mediciones ± desviación estándar

Figura 22. Actividad antioxidante del aceite esencial de orégano determinada en las emulsiones de margarina "Sabrina" y de dodecil sulfato de sodio.



Las diferencias observadas para valores de la AA del AE de orégano en la margarina y en la ESDS, pueden ser atribuidas a los siguientes factores: el contenido de oxígeno introducido durante la homogeneización de la muestra a altas velocidades, los antioxidantes presentes en los productos comerciales (β -carotenos, TBHQ, BHT, tocoferoles, etc), algunos componentes en la fase acuosa (aminoácidos, proteínas, surfactantes, ácidos, bases y buffers) y las características interfaciales, tales como carga eléctrica y las barreras física y química. Todos los factores mencionados anteriormente, influyen la localización y la acción de las sustancias protectoras, presentes en el AE, y de los pro-oxidantes, que se encuentran en el medio o se generan durante la reacción de oxidación [46-60].

Tabla 11. Actividad antioxidante del AE de orégano determinada en los sistemas MS y ESDS a través de la cuantificación del hexanal.

Aceite esencial, g/kg	MS			ESDS		
	$\bar{X}^*$	s	CV, %	$\bar{X}$	s	CV, %
1	35	2.4	6.8	18	3.0	16
5	71	17	24	24	3.2	13
10	91	5.1	5.6	40	3.4	8.7
20	95	0.8	0.9	69	0.5	0.7

*Promedio de tres mediciones

4.4. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE DOS ANTIOXIDANTES

Las mezclas de aceite esencial de orégano y vitamina E y del AE y el ácido ascórbico, evaluadas en la MS, presentaron las actividades antioxidantes, que aparecen en la **Tabla 12**. Las sustancias antioxidantes fueron mezcladas en las proporciones que se indicaron en la **Tabla 4**.

Tabla 12. Actividades antioxidantes de las mezclas de antioxidantes en la margarina "Sabrina" determinadas por medio de la cuantificación del hexanal.

Nombre	Actividad antioxidante, %		
	$\bar{X}^*$	s	CV, %
5 EO	95	1.0	1.0
10 EO	96	0.3	0.3
5 E	77	8.1	10
10 E	68	17	15
5 AO	77	5.3	6.9
10 AO	90	1.2	1.4
5 A	13	2.2	17
10 A	43	3.2	7.5
10 O	91	5.1	5.6

*Promedio de tres mediciones. EO: mezcla de la vitamina E y el AE de orégano, AO: mezcla del ácido ascórbico y el AE de orégano, E: vitamina E y O: orégano.

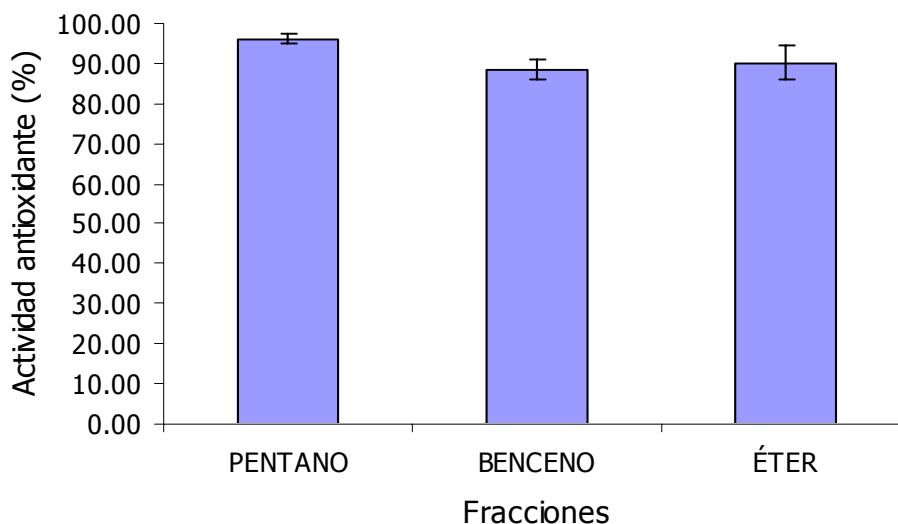
Las mezclas de la vitamina E y el AE de orégano mostraron actividad antioxidante similar a la observada para el AE de orégano sólo. La mezcla del ácido ascórbico y el AE de orégano en una relación 1:1 (10:10 g/kg) ejerció el efecto protector sobre el sustrato lipídico en la misma proporción que el AE sólo. Cuando la relación fue de 1:2 (5:10 g/kg), la protección del sustrato fue más baja. De acuerdo con ésto, se puede concluir, que no existe efecto sinérgico, ni aditivo, cuando se usa la mezcla de antioxidantes en las cantidades indicadas y, por el contrario, la mezcla del AE y el AC (2:1) disminuyó su actividad, quizás por el aumento de la actividad pro-oxidante de algunos de los compuestos presentes tanto en el AE como en la MS.

4.5. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE FRACCIONES DEL AE DE ORÉGANO

Las fracciones obtenidas por cromatografía de columna del aceite esencial de orégano con los solventes: pentano (P), éter (E) y benceno (B) fueron analizadas por HRGC-FID, obteniéndose los cromatogramas que se adjuntan en el **Anexo 5**. Estos cromatogramas indican que en la fracción P se extrajeron mayoritariamente α -felandreno, 1-octen-3-ol, β -mirceno, p-cimeno, limoneno, α -bergamoteno, β -cariofileno y óxido de cariofileno y carvacrol en cantidades muy pequeñas. En las fracciones B y E, el compuesto mayoritario fue carvacrol. La evaluación de la actividad antioxidante de las fracciones P, B y E, en concentraciones de 10 g/kg, mediante la cuantificación del hexanal en las mezclas de margarina, condujo a los resultados mostrados en la **Figura 23**. Estos datos indican que todas las fracciones en cantidades similares protegieron la margarina, pero la de P, a pesar de contener menor proporción de compuestos fenólicos, le brindó una protección mayor. Si la AA observada para el AE de orégano fuera exclusivamente debido a la presencia de los fenoles, ésta se vería reducida al utilizar la fracción P. De acuerdo con esto, se infiere que la AA de este aceite esencial resulta de la acción conjunta de las sustancias presentes en él y, probablemente, la alta concentración de los sesquiterpenos, α -bergamoteno, β -cariofileno y óxido de cariofileno, esté influenciando esta respuesta. Con respecto a la acción protectora de los terpenos, los estudios realizados por Pizzale, L. et al. [161] indican que algunos AE's con alta proporción de terpenos presentan mayor

actividad antioxidante en comparación con otro grupo de aceites que contienen compuestos fenólicos.

Figura 23. Actividad antioxidante de las fracciones del aceite esencial de orégano, obtenidas por cromatografía en columna.



Fracción (solvente)	Actividad antioxidante, %		
	$\bar{X}^*$	s	CV, %
Pentano	96	1.2	1.3
Benceno	89	2.6	2.9
Éter	90	4.1	4.6

*Promedio de tres mediciones

Como se mencionó anteriormente, el mecanismo de acción de los terpenos, en estos procesos de DO, aún no se ha esclarecido. Estudios realizados, por ejemplo, el de PUERTAS, M. A. et al. (2002) [63], con las diferentes fracciones del aceite esencial de orégano, obtenidas por cromatografía en contracorriente, han mostrado, que las fracciones con alto contenido de terpenos presentan una baja capacidad de atrapamiento de radicales. Se puede suponer, que los terpenos no actúan como “atrapadores” de radicales, sino como sustratos que se oxidan (se sacrifican), más rápidamente que el mismo aceite, emulsión o ácido graso, donde están presentes.

5. CONCLUSIONES

1. Se evaluó la actividad antioxidante de la vitamina E, el ácido ascórbico y los aceites esenciales de orégano, romero y cilantro, en las emulsiones lipídicas de margarina "Sabrina" y de dodecil sulfato de sodio, a través de la cuantificación del ácido linoleico y del hexanal, en un sistema de reacción donde el deterioro oxidativo se aceleró por medio de la radiación UVA-VIS.
2. Los aceites esenciales de cilantro, orégano y romero, la vitamina E y el ácido ascórbico exhibieron diferentes efectos antioxidantes en la margarina "Sabrina". Entre los aceites esenciales estudiados, el de orégano presentó mayor protección, seguido por los de cilantro y romero. El aceite esencial de orégano exhibió actividad antioxidante mayor a la de la vitamina E, para concentraciones de 1, 10 y 20 g/kg. Se determinó que la acción antioxidante de los aceites esenciales de orégano y cilantro aumentaba proporcionalmente con su concentración en la margarina.
3. Los valores de la actividad antioxidante del aceite esencial de orégano en la margarina "Sabrina", obtenidos a través de la cuantificación del ácido linoleico y del hexanal, presentaron diferencias estadísticamente significativas. Se determinó, que los valores de la actividad antioxidante del aceite esencial de orégano fueron diferentes al ser evaluados en la emulsión de margarina "Sabrina" o en la de dodecilsulfato de sodio.
4. Al evaluar la actividad antioxidante de las mezclas de la vitamina E con el aceite esencial de orégano y el ácido ascórbico con el mismo aceite, no se encontraron efectos sinérgico, ni aditivo. En la evaluación de la actividad antioxidante de las fracciones de pentano, éter y benceno, obtenidas a partir del aceite esencial de orégano, se encontró que todas las fracciones protegieron la margarina "Sabrina" en una proporción similar.

6. RECOMENDACIONES

Realizar un diseño experimental *in vitro*, para la obtención de un modelo matemático, que permita explicar las actividades antioxidantes observadas para los aceites esenciales de romero, orégano y cilantro, desde los sistemas más simples hasta los sistemas multicomponentes.

Investigar la capacidad de atrapamiento de los radicales ABTS[•] y DPPH[•], que presentan los principales sesquiterpenos, fitoconstituyentes de los aceites esenciales de orégano, romero y cilantro.

Estudiar la capacidad de atrapamiento de radicales de los fitoconstituyentes, que se encuentren presentes en los extractos obtenidos de plantas nativas de Colombia.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GUTTERIDGE, J. M. C. and HALLIWELL, B. Antioxidants in nutrition, health and disease. Oxford. Oxford University Press. 1998. p 90-102.
2. BLÁHA, V., *et al.* Bioanalysis of PUFA metabolism and lipid peroxidation in coronary atherosclerosis. En: J. Pharm. Biomed. Anal. Vol. 22 (2000); p. 563-572.
3. POKORNY, J., YANISHLIEVA, N. and GORDON, M. Antioxidants in food: practical applications. Cambridge England. CRC Press, Woodhead publishing limited. 2001. p 1-380.
4. SIMIC, M. G. and KAREL, M. Autoxidation in food and biological systems. New York. Plenum Press. 1980. p 261-282.
5. HSIEH, R. J. and KINSELLA, J. E. Oxidation of polyunsaturated fatty acids: mechanisms, products, and inhibition with emphasis on fish. Academic Press Inc. 1989. p 233-335.
6. COOK, G. P., *et al.* The effects of secondary structure and O₂ on the formation of direct strand breaks upon UV irradiation of 5 bromodeoxy-uridine containing oligonucleotides. En: Chem. Biol. Vol. 6 (1999); p 451-459.
7. BROWN, G., LEVIN, G. and MURPHY, S. Purine N-oxides. XII. Photochemical changes induced by ultraviolet radiation. En: Biochem. Vol. 3 (1964); p 880-883.
8. SONG, J. M., MILLIGAN, J. R. and SUTHERLAND, B. M. Bistranded oxidized purine damage clusters: induced in DNA by long-wavelegth Ultraviolet (290-400 nm) radiation?. En: Biochem. Vol 41 (2002); p 8683-8688.
9. WALL, J. Antioxidants in prevention of reperfusion damage of vascular endothelium. Online: <http://www.tcd.ie/tsmj/2000/2000pdf/antiox.pdf>.
10. REDPATH, J. L. Radical reactions with simple biochemical system. En: J. Chem. Edu. Vol 58 (1981); p 131.
11. KUMAR, P., ANAND, P. and SANKHALKAR, S. Oxidative damage and changes in activities of antioxidant enzymes in wheat seedlings exposed to ultraviolet-B radiation. Online: <http://www.nsc.ernet.in/currsci/august/articles15.htm>.

12. WARD, J. F. Radiolytic damage to genetic material. En: J. Chem. Edu. Vol 58 (1981); p 135.
13. BALLARE, C. L., *et al*. Impacts of solar ultraviolet-B radiation on terrestrial ecosystems of tierra del fuego (southern Argentina) an overview of recent progress. En: J. Photochem. Photobiol. B. Vol 62 (2001); p 67-77.
14. HADER, D. P., *et al*. Effects on aquatic ecosystems. En: J. Photochem. Photobiol. B. Vol 46 (1998); p 53-68.
15. CALDWELL, M. M., *et al*. Effects of increased solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems. En: J. Photochem. Photobiol. B. Vol 46 (1998); p 40-52.
16. LONGSTRETH, J., *et al*. Health risks. En: J. Photochem. Photobiol. B. Vol 46 (1998); p 20-39.
17. NORVAL, M. Effects solar radiation on the human immune system. En J. Photochem. Photobiol. B. Vol 63 (2001); p 28-40.
18. SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. San Diego. Academic press. 1991. p 57-79, 259-267, 319-332, 399-416.
19. VALENZUELA, A. and NIETO, S. Synthetic and natural antioxidants: food quality protectors. En: Grasas y Aceites. Vol 47 (1996); p 186-196.
20. SIMIC, M. G. Free radical mechanisms in autoxidation processes. En: J. Chem. Edu. Vol 58 (1981); p 125.
21. HOWELL, N. K. and SAEED, S. the efect of antioxidants on the production of lipid oxidation products and transfer of free radicals in oxidized. Online: <http://cabi-publishing.org/bookshop/readingroom/0851993346/3346ch4pdf>.
22. MADHAVI, D., DESHPANDE, S. and SALUNKHE, D. Food antioxidants: technological and health perspectives. New York. Marcel Dekker Inc. 1996. p 267-359.
23. MAESTRO, R. and BORJA, R. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. En: Grasas y Aceites. Vol 44 (1993); p 101-106.
24. SCHWARZ, K., *et al*. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. En: Eur. Food Res. Technol. Vol 212 (2001); p 319-328.

25. WIDYARINI, S., *et al.* Isoflavonoid compounds from red clover (*trifolium pratense*) protect from inflammation and immune suppression induced by uv radiation. En: Photochem. Photobiol. Vol 74 (2001); p 465.
26. GAMEL, T. H. and KIRITSAKIS, A. Effect of methanol extracts of rosemary and olive vegetable water on the stability of olive oil and sunflower oil. En: Grasas y Aceites. Vol 50 (1999); p 345-350.
27. KOUL, A., BHATIA, V. and BANSAL, M. P. Effect of alpha-tocopherol on pulmonary antioxidant defence system and lipid peroxidation in cigarette smoke inhaling mice. Online: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1472-2091-2-14.pdf>.
28. EMMONS, CH., PETERSON, D. and PAUL, G. Antioxidant capacity of oat (*Avena Sativa* L.) Extracts. 2. In vitro Antioxidant activity and contents of phenolic and tocol antioxidants. En: J. Agric. Food Chem. Vol 47 (1999); p 4894-4898.
29. SU, Y., *et al.* Antioxidant activity of flavonoids isolated from *scutellaria rehderiana*. En: JAOCS. Vol 77 (2000); p 807-812.
30. APARICIO, R., *et al.* Effect of various compounds on virgin olive oil stability measured by rancimat. En: J. Agric. Food Chem. Vol 47 (1999); p 4150-4155.
31. PUERTAS, M. A., *et al.* *In vitro* radical scavenging activity of essential oils from columbian plants and fractions from oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil. En: Flavour Fragr. J. Vol 17 (2002); p 380-384.
32. RUBERTO, G., *et al.* Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from Algerian *Origanum glandulosum* Desf. En: Flavour Fragr. J. Vol 17 (2002); p 251-254.
33. BOTSOGLOU, N. A., *et al.* Effect of dietary oregano essential oil on performance of chickens and on iron-induced lipid oxidation of breast, thigh and abdominal fat tissues. En: Br. Poultry Sci. Vol 43 (2002); p 223-230.
34. MILOS, M., MASTELIC, J. and JERKOVIS, I. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *Hirtum*). En: Food Chem. Vol 71 (2000); p 79-83.
35. FADEL, H. H. M. and EL-MASSRY, K. F. *Rosmarinus officinalis* L. effect of drying on the volatile oil fresh leaves and antioxidant activity of their extracts. En: J. Essent. Oil-Bearing Plants. Vol 3 (2000); p 5-19.

36. BARRATA, M. T., *et al.* Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. En: J. Essent. Oil Res. Vol 3 (1998^a); p 618-627.
37. BARRATA, M. T., *et al.* Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. En: Flavour Fragr. J. Vol 13 (1998^b); p 235-244.
38. DORMAN, H. J. D., SURAI, P. and DEANS, S. G. *In vitro* antioxidant activity of a number of plant essential oils and phytoconstituents. En: J. Essent. Oil Res. Vol 12 (2000); p 241-248.
39. FARAG, R. S., ALÍ, M. N. and TAHA, S. H. Use of some essential oils as natural preservatives for butter. En: Grasas y Aceites. Vol 39 (1988); p 28-31.
40. ZYGADLO, J., *et al.* Empleo de aceites esenciales como antioxidantes naturales. En: Grasas y Aceites. Vol 46 (1995); p 285-288.
41. FERREIRA, M. Desarrollo y validación de un método para el análisis cuantitativo de compuestos carbonílicos, productos finales de degradación oxidativa de lípidos. Bucaramanga, 1997, 116 p. Trabajo de grado (Maestría en Química). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias.
42. DELGADO, W. A. Evaluación en dos sistemas lipídicos modelo de la actividad antioxidante *in-vitro* de tres aceites esenciales extraídos de plantas pertenecientes a la familia Umbelliferae. Bucaramanga, 2002, 70 p. Trabajo de grado (Maestría en Química). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias.
43. FUENTES, H. V. Monitoreo de la termodegradación de los ácidos grasos en los aceites vegetales de consumo humano, por medio de la cromatografía de gases de alta resolución y evaluación *in vitro* de la actividad antioxidante de productos naturales. Bucaramanga, 1999, 131 p. Trabajo de grado (Química). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias.
44. CERVANTES, M. Estudio de los metabolitos secundarios de salvia negra (Lepechinia Schiedeana) obtenidos por diferentes métodos de extracción y determinación de su posible actividad antioxidante *in vitro*. Bucaramanga, 1999, 118 p. Trabajo de grado (Química). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias.

45. STASHENKO, E. E., *et al.* Solid-phase microextraction with on-fibre derivatisation applied to the analysis of volatile carbonyl compounds. En: J. Chromatogr. A. Vol 886 (2000); p 175-181.
46. -SCHWARZ, K., *et al.* Activities of antioxidants are affected by colloidal properties of oil in water and water-in-oil emulsions and bulk oils. En: J. Agric. Food Chem. Vol 48 (2000); p 4874-4882.
47. FRANKEL, E. N., HUANG, S. W. and KANNER, J. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oil vs emulsions. En: J. Agric. Food Chem. Vol 42 (1994); p 1054-1059.
48. HUANG, S. W., *et al.* Effect of pH on antioxidant activity of α -tocopherol and trolox in oil-in-water emulsions. En: J. Agric. Food Chem. Vol 44 (1996); p 2496-2502.
49. FOTI, M., *et al.* Flavonoids, coumarins, and cinnamic acids as antioxidants in a micellar system. Structure-activity relationships. En: J. Agric. Food Chem. Vol 44 (1996); p 497-501.
50. ROGINSKY, V. A., *et al.* Moderate antioxidative efficiencies of flavonoids during peroxidation of methyl linoleate in homogeneous and micellar solutions. En: JAOCS. Vol 73 (1996); p 777-786.
51. PRYOR, W. A., STRICKLAND, T. and CHURCH, D. Comparison of the efficiencies of several natural and synthetic antioxidants in aqueous sodium dodecyl sulfate micelle solutions. En: J. Am. Chem. Soc. Vol 110 (1988); p 2224-2229.
52. COLEMAN, J.E., HAMPSON, J.W. and SAUNDERS, D.H. Autoxidation of fatty materials in emulsion. II. Factors affecting the histidine- catalyzed autoxidation of emulsified methyl linoleate. En: JAOCS II. Vol 41 (1964); p 347-351.
53. JACOBSEN, C., *et al.* Partitioning of selected antioxidants in mayonnaise. En: J. Agric. Food Chem. Vol 41 (1999); p 3601-3610.
54. PEKKARINEN, S., STOCKMANN, H. and SCHWARZ, K. Antioxidant activity and partitioning of phenolic acids in bulk and amulsified methyl linoleate. En: J. Agric. Food Chem. Vol 47 (1999); p 3036-3043.
55. HUANG, S. W., *et al.* Antioxidant activity of alpha-tocopherol and trolox in different lipid substrates: bulk oil vs oil in water emulsions. En: J. Agric. Food Chem. Vol 44 (1996); p 444-452.

56. SÁNCHEZ, M. C., et al. Evolución de la cinética de emulsificación y de las propiedades reológicas de emulsiones aceite vegetal en agua preparadas con dos tipos de agitadores. En: Grasas y Aceites. Vol 52 (2001); p 222-228.
57. RIEGO, M. and GÓMEZ, C. Solubilidad de emulsionantes alimentarios lipófilos en medios acuosos. I. Sistemas formados por agua, etanol y tensoactivos derivados de sorbitano. En: Grasas y Aceites. Vol 38 (1987); p 313-317.
58. RIEGO, M. and GÓMEZ, C. Química-Física interfacial de emulsificantes alimentarios. Parte I. Solubilidad e interacción con medios acuosos. En: Grasas y Aceites. Vol 39 (1988); p 44-51.
59. PONGINEBBI, L., NAWAR, W. and CHINACHOTI, P. Effect of relative humidity on lipid oxidation in freeze-dried emulsions. En: Grasas y Aceites. Vol 51 (2000); p 348-354.
60. ROBINS, M. Lipid emulsions. En: Grasas y Aceites. Vol 51 (2000); p 26-34.
61. VAN RUTH, S., ROOZEN, J. and POSTHUMUS, M. Volatile composition of sunflower oil-in- water emulsions during initial lipid oxidation: influence of pH. En: J. Agric. Food Chem. Vol 47 (1999); p 4365-4369.
62. MEI, L., MCCLEMENTS, D. and DECKER, E. Lipid oxidation in emulsions as affected by charge status of antioxidants and emulsion droplets. En: J. Agric. Food Chem. Vol 47 (1999); p 2267-2273.
63. PUERTAS, M. Desarrollo de un método analítico para la determinación de compuestos carbonílicos volátiles y la evaluación de la posible actividad antioxidante *in vitro* de algunos productos naturales y sintéticos. Bucaramanga, 2002, 193 p. Trabajo de grado (Doctor en Química). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias.
64. BELITZ, H. D. and GROSCH, W. Food Chemistry. Berlin. Springer-Verlag. 1999. p 184-234.
65. SHERWIN, E. R. Oxidation in fat and oil processing. En: JAOCS. Vol 55 (1978); p 809-814.
66. PAPADOULOS, K., *et al.* Evaluation of food antioxidant activity by photostorage chemiluminescence. En: Anal. Chim. Acta. Vol 433 (2001); p 263-268.
67. PÉREZ, F. and PERMANYER, J. Estudio de las alteraciones termooxidativas de los aceites vegetales: aceite de oliva virgen y aceite de girasol refinado. En: Grasas y Aceites. Vol 37 (1986); p 29-32.

68. PÉREZ-CAMINO, M., MÁRQUEZ-RUIZ, G. and DOBARGANES, M. Alteración de grasas usadas en frituras. I. Comportamiento de aceites de oliva y girasol en freidoras domésticas. En: Grasas y Aceites. Vol 38 (1987); p 307-312.
69. HAMID, A. and RAHMAN, A. Effect of copper and unsaturated fatty acids on the autoxidation of butter oil. En: Grasas y Aceites. Vol 26 (1975); p 293-295.
70. PELLEGRINI, N., VISIOLI, F. and BURATTI, S. Direct analysis of total antioxidant activity of olive oil and studies on the influence of heating. En: J. Agric. Food Chem. Vol 49 (2001); p 2532-2538.
71. HIDALGO, F., ZAMORA, R. ALAIZ, M. Modificaciones producidas en las proteínas alimentarias por su interacción con lípidos peroxidados. I. Química radicalaria de los ácidos grasos poliinsaturados. En: Grasas y Aceites. Vol 42 (1991); p 379-386.
72. LIN, J. N. and KAO, C. H. Effect of oxidative stress caused by hydrogen peroxide on senescence of rice leaves. Online: <http://ejournal.sinica.edu.tw/bbas/content/1998/3/bot93-03.pdf>.
73. AHMAD, S. Oxidative Stress and antioxidant defenses in biology. New york. Chapman & Hall; ITP international thomson publishing company.1995. p 4-45.
74. HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE, J. M. Free radicals in biology and medicine. New York. Oxford university press INC. 1989. p 22-81, 86-179, 188-266.
75. FUCHS, J. and PACKER, L. Oxidative stress in dermatology. New York. Marcel Dekker Inc. 1993. p 29, 49, 67.
76. STOREY, K. B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. En: Brazilian Journal of Medical and Biological Research. Vol 29 (1996); p 1715-1733.
77. MAKINEN, M. Lipid hydroperoxides: Effects of tocopherols and ascorbic acid on their formation and decomposition. Academic dissertation, University of Helsinki. Helsinki, 2002. Online: <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/maa/skemi/vk/makinen/lipidhyd.pdf>.
78. STRATTON, S. P. and LIEBLER, D. C. Determination of singlet oxygen-specific versus radical-mediated lipid peroxidation in photosensitized oxidation of lipid bilayers: effect of β carotene and α -tocopherol. En: Biochem. Vol 36 (1997); p 12911-12920.
79. PAILLOUS, N. and FERY-FORGUES, S. Interest of photochemical methods for induction of lipid peroxidation. En: Biochimie. Vol 76 (1994); p 355-368.

80. MIN, D. B. and BOFF, J. M. Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. En: Comprehensive Reviews in food science and food safety. Vol 1 (2002); p 58-72.
81. SIEH, R. J. and KINSELLA, J. E. Oxidation of polyunsaturated fatty acids: Mechanisms, products, and inhibition with emphasis on fish. Advances in food and nutrition research. Academic press, Inc. 1989. p 233-335.
82. MUELLER, M. J. Radically Novel prostaglandins in animal and plants: the isoprostanes. En: Chem. Biol. Vol 5 (1998); p 323-333.
83. HILDEBRAND, D. F., AFITLHILE, M. and FUKUSHIGE, H. Regulation of oxylipin synthesis. Lipids and signalling: oxylipins 2-further reactions for oxylipin production. En: Biochem. Soc. Trans. Vol 28 (2000); p 847-849.
84. THYRION, F. The production of natural antioxidants (other vitamin E). Lipid Synth. Manuf. Sheffield academic press. 1999. p 268-287. Resumen en: Chemicals Abstracts. Vol 132 (2000).
85. TIWARI, K. Natural product antioxidants and their therapeutic potencial in mitigating peroxidative modification of lipoproteins and atherosclerosis: recent development. En: J. Med. Aromat. Plant Sci. Vol 21 (1999); p 730-741. Resmen en: Chemicals Abstracts. Vol 133 (2000).
86. CHU, N. and BIJUN, X. Evaluation of the antioxidant and pro-oxidant effects of tea catechin oxypolymers. En: J. Agric. Food Chem. Vol 48 (2000); p 6362-6366.
87. SHIOWY, W. and HONG, J. Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen. En: J. Agric. Food Chem. Vol 48 (2000); p 5677-5684.
88. IRWANDI, J., MAN, B. and KITTS, D. Synergies between plant antioxidant blends in preventing peroxidation reactions in model and food oil systems. En: J. Am. Oil Chem. Soc. Vol 77 (2000); p 945-950. Resumen en: Chemicals Abstacts. Vol 133 (2000).
89. SHAHIDI, F. Natural phenolic antioxidants and their food applications. En: Lipid Technol. Vol 12 (2000); p 80-84. Resumen en: Chemicals Abstracts. Vol 133 (2000).
90. MEDINA, I., SATUE-GRACIA, T. and GERMAN, B. Comparison of natural polyphenol antioxidants from extra virgin olive oil with synthetic antioxidants in tuna lipids during thermal oxidation. En: J. Agric. Food Chem. Vol 47 (1999); p 4873-4879.

91. POVILAITYTĖ, V. and VENSKUTONIS, P. Antioxidative activity of purple peril (*Perilla frutescens* L.) Moldivian Dragon head (*Dracocephalum moldavica* L.) and Roman Chamomile (*Anthemis nobilis* L.) extracts in rapeseed oil. *En: JAOCS*. Vol 77 (2000); p 951-956.
92. GAMEL, T. H., KIRITSAKIS, A. and PETRAKIS, CH. Effect of phenolic extracts on trans fatty acid formation during frying. *En: Grasas y Aceites*. Vol 50 (1999); p 421-425.
93. ÖZCAN, M. Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extracts on natural olive and sesame oils. *En: Grasas y Aceites*. Vol 50 (1999); p 355-358.
94. DAMECHKI, M., SOTIROPOULOU, S. and TSIMIDOU, M. Antioxidant and pro-oxidant factors in oregano and rosemary gourmet olive oils. *En: Grasas y Aceites*. Vol 52 (2001); p 207-213.
95. MAESTRO, R., LEÓN, R. and RUIZ-GUTIERREZ, V. Los compuestos fenólicos en la autodefensa de los vegetales. *En: Grasas y Aceites*. Vol 44 (1993); p 365-369.
96. HEATH, H.B. Source book of flavors. New York. Van Nostrand Reinhold. 1981. p 5-6.
97. MCCLEMENTS, D. J. and DECKER, E. A. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *En: Concise reviews in food science*. Vol 65 (2000); p 1270-1282.
98. GRAY, J. I. Measurement of lipid oxidation: a review. *En: JAOCS*. Vol 55 (1978); p 539.
99. MOYA, M., MENDOZA, D. and AMEZQUITA, F. Analytical evaluation of polyunsaturated fatty acids degradation during thermal oxidation of edible oils by fourier transform infrared spectroscopy. *En: Talanta*. Vol 50 (1999); p 269-275.
100. HENDERSON, D. E. and SLICKMAN, M. Quantitative HPLC determination of the antioxidant activity of capsaicin on the formation of lipid hydroperoxides of linoleic acid: a comparative study against BHT and melatonin. *En: J. Agric. Food Chem*. Vol 47 (1999); p 2563-2570.
101. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Fatty Acids in Oils and Fats, preparation of Methyl Esters. Virginia-USA: AOAC, 1990. p 963-965. (AOAC, 965.33, 965.49, 963-965).
102. HAMILTON R. J. and HAMILTON S. Lipid analysis: A practical approach. USA. IRL press, Oxford university press. 1992. p 47-48.

103. CRISTIE, W. Advances in lipid methodology: two. Gran Bretaña. The oily press. 1993. p 76.
104. DOBARGANES, M., RÍOS, J. and PÉREZ-CAMINO, M. Relaciones entre la composición de aceites vegetales y los componentes volátiles producidos durante su termoxidación. En: Grasas y Aceites. Vol 38 (1987); p 307-312.
105. SNYDER, J. M., FRANKEL, E. and SELKE, E. Gas chromatographic analyses of headspace volatiles from vegetable oil. En: JAOCS. Vol 62 (1985); p 12.
106. ROBERTS, D., POLLIEN, P. and MILO, C. Solid phase microextraction method development for headspace analysis of volatile flavor compounds. En: J. Agric. Food Chem. Vol 48 (2000); p 2430-2437.
107. JELÉN, H., OBUCHAUSKA, M. and ZAWIRSKA-WOJTASIAK, R. Headspace solid-phase microextraction use for the characterization of volatile compounds in vegetable oils of different sensory quality. En: J. Agric. Food Chem. Vol 48 (2000); p 2360-2367.
108. WU, H. and LIN, J. Determination of aldehydic lipid peroxidation products with dabsyl hydrazine by high-performance liquid chromatography. En: Anal. Chem. Vol 67 (1995); p 1603-1612.
109. HOSHIKA, Y. Sensitive gas chromatographic determination of lower aliphatic carbonyl compounds as their pentapluorophenylhydrazones. En: J. Chromatogr. Vol 152 (1978); p 224-227.
110. KOBAYASHI, K., *et al.* Gas chromatographic of low molecular weight carbonyl compounds in aqueous as their pentafluorophenylhydrazones. En: J. Chromatogr. Vol. 176 (1979); p 118-122.
111. BANDONI A. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Universidad Nacional de la Plata. 2000. p 29.
112. MURPHY, M. Plants products as antimicrobial agents. En: Clinical microbiology Reviews. 1999. p 564-582.
113. GORSIOU, P., NAXAKIS, G. and SKOULA, M. Diversity in the composition of monoterpenoids of Origanum microphyllum (Labiatae). En: Biochem. Syst. Ecol. Vol 30 (2002); p 865-879.

114. TKACHENKO, K. G. and TKACHEV, A. V. Component composition of the essential oil of Origanum vulgare L. Grow in Leningrade region: En Rastitel'nye Resursy. Vol 38 (2002); p 97-101.
115. BARAZANDEH, M. M. Essential oil composition of Origanum majorana L. From Iran. En: J. Essent. Oil Res. Vol 13 (2001); p 76-77.
116. BASER, K. H. C., *et al*. Composition of the essential oil of Origanum floribundum munby from Algeria. En: J. Essent. Oil Res. Vol 12 (2000); p 753-756.
117. GUERRERO, T. M. and JOHNSON, C. B. Season has a major effect on the essential oil yield responde to nutrient supply in Origanum majorana. En: J. Hort. Sci. Biotechnol. Vol 75 (2000); p 520-527.
118. D'ANTUONO, L. F., GALLETTI, G. C. and BOCCHINI, P. Variability of essential oil content and composition of Origanum vulgare L. populations from a north mediterranean área (Liguria region, northern italy). En: Annals of Botany. Vol 86 (2000); p 471-478.
119. BASER, K.H.C., DUMAN, H. and AYTAC, Z. Composition of the essential oil of Origanum x adanense. En: J. Essent. Oil Res. Vol 12 (2000); p 475-477.
120. CHITRA, P., and MATHELA, C. S. Essential Oil composition of Origanum vulgare L. ssp vulgare from the Kumaon Himalayas. En: J. Essent. Oil Res. Vol 12 (2000); p 441-442.
121. TASKINEN, J. and NYKÄNEN, L. Volatile constituents obtained by the extraction with alcohol-water mixture and by steam distillation of coriander fruit. En: Acta Chem. Scand. Vol 29 (1975); p 425-429. Resumen en: LAWRENCE, B. M. Essential Oils 1976-1978. Illinois. Allured Publishing Corporation. 1979. p 30.
122. SCHWENKER, G. and KLÖHN, W. Gas-chromatographische Untersuchungen über die Zusammensetzung von Rosmarinölen. En: Arch. Pharm. Vol 296 (1963); p 845-854. Resumen en: LAWRENCE, B. M. Essential Oils 1976-1978. Illinois. Allured Publishing Corporation. 1979. p 34.
123. MAARSE, H. and VAN OS, F. H. L. Volatile oil Origanum vulgare L. ssp. vulgare. III. Changes in composition during maturation. En: Flavour Ind. Vol 5 (1974); p 278-281. Resumen en: LAWRENCE, B. M. Essential Oils 1976-1978. Illinois. Allured Publishing Corporation. 1979. p 42.

124. CHOU, J. S. T. Analytical results on the volatile components of cardamon oil, caraway oil and coriander oil by gas chromatography, IR spectroscopy, etc. En: Koryo. Vol 106 (1974); p 55-60. Resumen En: LAWRENCE, B. M. Essential Oils 1979-1980. Illinois. Allured Publishing Corporation. 1981. p 26.
125. SKRUBIS, G., Seven wild aromatic plants growing in Greece and their essential oils. En: Flavour Ind. Vol 3 (1972); p 571, 566-568. Resumen En: LAWRENCE, B. M. Essential Oils 1979-1980. Illinois. Allured Publishing Corporation. 1981. p 50.
126. LAWRENCE, B. M. Essential Oils 1979-1980. Illinois. Allured Publishing Corporation. 1981. p 50
127. GUPTA, G. K., DHAR, K. L. and ATAL, C. K. Chemical constituents of Coriandrum sativum L. seeds. En: Indian Perfum. Vol 21 (1977); p 86-90. Resumen en: LAWRENCE, B. M. Essential Oils 1981-1987. Illinois. Allured Publishing Corporation. 1989. p 24.
128. FORMACEK, K. and KUBECZKA, K. H. Essential oils analysis by capillary chromatography and carbón-13 NMR spectroscopy. New York. J. Wiley & sons. 1982. Resumen en: LAWRENCE, B. M. Essential Oils 1981-1987. Illinois. Allured Publishing Corporation. 1989. p 100.
129. RHYU, H. Y. Gas chromatographic characterization of oregano and selected spices of Labiatae family. En: J. Food Sci. Vol 44 (1979); p 1373-1378. Resumen en: LAWRENCE, B. M. Essential Oils 1981-1987. Illinois. Allured Publishing Corporation. 1989. p 61.
130. BOELEN, M. H. The essential oil from Rosmarinus officinalis L. En: Perfum. Flav. Vol 10 (1985); p 21-37. Resumen en: LAWRENCE, B. M. Essential Oils 1981-1987. Illinois. Allured Publishing Corporation. 1989. p 180.
131. HALVA, S., *et al.* Yield and glucosinolate of Mustard seeds and volatile oils of caraway seeds and coriander fruit III. Yield and volatile oils of coriander fruit (Coriandrum sativum L.). En: J. Agric. Sci. Finland. Vol 58 (1986); p 169-172. Resumen en: LAWRENCE, B. M. Essential Oils 1988-1991. Illinois. Allured Publishing Corporation. 1993. p 14.

132. LAMPARSKY, D. and KLIMES, I. Heterocyclic trace components in the essential oil of coriander. En: *Perfum. Flav.* Vol 13 (1988); p 17-25. Resumen en: LAWRENCE, B. M. *Essential Oils 1988-1991*. Illinois. Allured Publishing Corporation. 1993. p 129.
133. LASSANYI, ZS. and LORINCZ, C. Test on terpenoids presents in parts of Coriandrum sativum L. I. Thin-layer chromatographic examination of the volatile oil of pericarpium and seedling of the "Lucs" variety. En: *Acta Agron. Acad. Scient. Hung.* Vol 16 (1967); p 95-100. Resumen en: LAWRENCE, B. M. *Essential Oils 1976-1978*. Illinois. Allured Publishing Corporation. 1979. p 30.
134. LASSANYI, Z. and LORINCZ, C., Test on terpenoids presents in parts of Coriandrum sativum L. III. Histology of the developing structures of Coriandrum sativum L. Var "Luc" and properties of volatile oils canals. En: *Acta Agron. Acad. Scient. Hung.* Vol 19 (1970); p 25-32. Resumen en: LAWRENCE, B. M. *Essential Oils 1976-1978*. Illinois. Allured Publishing Corporation. 1979. p 30.
135. MACLEOD, A. J. and ISLAM, R. Volatile flavour components of coriander leaf. En: *J. Sci. Food Agric.* Vol 27 (1976); p 721-725. Resumen en: LAWRENCE, B. M. *Essential Oils 1976-1978*. Illinois. Allured Publishing Corporation. 1979. p 30.
136. PERINEAU, F., GANOU, L. and BESSIERE, J. M. Hydrodistillation du fruit de coriandre. En: *Parfum. Cosmet. Arômes.* Vol 98 (1991); p 79-84. Resumen en: LAWRENCE, B. M. *Essential Oils 1988-1991*. Illinois. Allured Publishing Corporation. 1993. p 183.
137. POTTER, T. L. Essential oil composition of cilantro. En: *J. Agric. Food Chem.* Vol 44 (1996); p 1824-1826.
138. ROSUA, J. L. and GARCIA-GRANADOS, A. Analyse des huiles essentielles d'especes du genre Rosmarinus L. et leur interet entant que caractere taxonomique. En: *Plant. Med. Phytotherap.* Vol 21 (1987); p 138-143. Resumen en: LAWRENCE, B. M. *Essential Oils 1988-1991*. Illinois. Allured Publishing Corporation. 1993. p 50.
139. FOURNIER, G., *et al.* Etude de divers echantillons d'huile essentielle de romarin de Tunisie. En: *Plant. Medic. Phytoth.* Vol 23 (1989); p 180-185. Resumen en: LAWRENCE, B. M. *Essential Oils 1988-1991*. Illinois. Allured Publishing Corporation. 1993. p 136.

140. SCHEFFER, J. J. C., *et al.* The essential oils of three *Origanum* species grown in turkey. En: In progress in essential Oil Research. Berlín. E. J. Brunke, Walter de Gruyter. 1986. Resumen en: LAWRENCE, B. M. Essential Oils 1988-1991. Illinois. Allured Publishing Corporation. 1993. p 45.
141. KAZARINOVA, N. V., *et al.* Component composition and analysis of antibiotic activity of essential oil of Origanum vulgare L. grown in certain regions of west Siberia. En: Rastitel'nye resursy. Vol 38 (2002); p 99-103.
142. SALGAR, W. Evaluación en dos sistemas lipídicos modelo de la actividad antioxidante *in vitro* de aceites esenciales extraídos de las plantas pertenecientes a la familia Labiatae. Bucaramanga, 2002, 79 p. Trabajo de grado (Maestría en Química). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias.
143. CONTRERAS, N. Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* de algunos aceites esenciales en el proceso de peroxidación lipídica inducida por la radiación ultravioleta. Bucaramanga, 2002, . Trabajo de grado (Maestría en Química). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias.
144. GIL, A. *et al.* Coriander essential oil composition from two genotypes grown in different environmental conditions. En: J. Agric. Food Chem. Vol 50 (2002); p 2870-2877.
145. GIAMPERI, L., FRATERNALE, D. and RICCI, D. The *in vitro* action of essential oils on different organism. En: J. Essent. Oil Res. Vol 14 (2002); p 312-318.
146. TRABOULSI, A. F., *et al.* Insecticidal properties of essential plant oils against the mosquito Culex pipiens molestus (Diptera: culicidae). En: Pest manage. Sci. Vol 58 (2002); p 491-495.
147. YILDIRIM, I. and ÔZCAN, M. Use of oregano and cumin essential oils as disinfectant on hatching quail eggs. En: Hayvancilik Arastirma Dergisi. Vol 11 (2001); p 61-63.
148. HORNE, D., *et al.* Antimicrobial effects of essential oils on Streptococcus pneumoniae. En: J. Essent. Oil Res. Vol 13 (2001); p 387-392.
149. BEN HAMIDA-BEN, E. N., *et al.* Antibacterial screening of Origanum majorana L. oil from Tunisia. En: J. Essent. Oil Res. Vol 13 (2001); p 295-297.

150. BARICEVIV, D., MILEVOJ, L. and BORSTNIK, J. Insecticidal effect of oregano (Origanum vulgare L. ssp. Hirtum letswaart) on bean weevil (Acanthoscelides obtectus say). En: Int. J. Hort. Sci. Vol 7 (2001); p 84-88.
151. ÔZCAN, M. and ERKMEN, O. Antimicrobial activity of the essential oils of Turkish plant spices. En: Eur. Food Res. Technol. Vol 212 (2001); p 658-660.
152. LAMIRI, A., *et al.* Insecticidal effects of essential oils against Hessian fly, Mayetiola destructor (say). En: Field crops Res. Vol 71 (2001); p 9-15
153. SKANDAMIS, P., *et al.* Inhibition of oregano essential oil and EDTA on Escherichia coli O157:H7. En: Ital. J. Food Sci. Vol 13 (2001); p 65-75.
154. TUNC, I., *et al.* Ovicidal activity of essential oils from five plants against two stored-product insects. En: J. Stored Prod. Res. Vol 36 (2000); p 161-168.
155. DEFERERA, D. J., ZIOGAS, B. N. and POLISSIOU, M. G. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on Penicillium digitatum En: J. Agric. Food Chem. Vol 48 (2000); p 2576-2581.
156. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Animal and vegetable fats and oil- Analysys by gas chromatography of methyl esters of fatty acids. Geneve: ISO, 1990. 1-7 p. (ISO 5508).
157. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Animal and vegetable fats and oil- Preparation of methyl esters of fatty acids. Geneve: ISO, 1978. 1-6 p. (ISO 5509).
158. KUBECZKA, K. H. Progress in isolation techniques for essential oil constituents. Resumen en: SVENDSEN, A. B. and SCHEFFER, J. J. C. Essential oils and aromatic plants. Holanda. DR W. Junk Publishers. 1985. p 107-126.
159. CHOI, H. S., *et al.* Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. En: J. Agric. Food Chem. Vol 48 (2000); p 4156-4161.
160. WILLIAMS, W. B., COVELIER, M. E. and BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. En: Lebensm.-Wiss. U.-Technol. Vol 28 (1995); p 25-30,

161. PIZZALE, L., et. al., Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of different Botanical origin. Online: [http:// www. richrom. com/ assets/ CD23PDF /m11.pdf](http://www.richrom.com/assets/CD23PDF/m11.pdf)

8. BIBLIOGRAFÍA

AHMAD, S. Oxidative Stress and antioxidant defenses in biology. New York. Chapman & Hall; ITP international thomson publishing company. 1995. p 4-45. [73]

APARICIO, R., *et al.* Effect of various compounds on virgin olive oil stability measured by rancimat. En: J. Agric. Food Chem. Vol 47 (1999); p 4150-4155. [30]

BALLARE, C. L., *et al.* Impacts of solar ultraviolet-B radiation on terrestrial ecosystems of tierra del fuego (southern Argentina) an overview of recent progress. En: J. Photochem. Photobiol. B. Vol 62 (2001); p 67-77. [13]

BANDONI A. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Universidad Nacional de la Plata. 2000. p 29. [111]

BARAZANDEH, M. M. Essential oil composition of Origanum majorana L. From Iran. En: J. Essent. Oil Res. Vol 13 (2001); p 76-77. [115]

BARICEVIV, D., MILEVOJ, L. and BORSTNIK, J. Insecticidal effect of oregano (Origanum vulgare L. *ssp.* Hirtum letsmaat) on bean weevil (Acanthoscelides obtectus say). En: Int. J. Hort. Sci. Vol 7 (2001); p 84-88. [150]

BARRATA, M. T., *et al.* Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. En: J. Essent. Oil Res. Vol 3 (1998^a); p 618-627. [36]

_____. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. En: Flavour Fragr. J. Vol 13 (1998^b); p 235-244. [37]

BASER, K. H. C., *et al.* Composition of the essential oil of Origanum floribundum munby from Algeria. En: J. Essent. Oil Res. Vol 12 (2000); p 753-756. [116]

_____. Composition of the essential oil of *Origanum x adanense*. En: J. Essent. Oil Res. Vol 12 (2000); p 475-477. [119]

BELITZ, H. D. and GROSCH, W. Food Chemistry. Berlin. Springer-Verlag. 1999. p 184-234. [64]

BEN HAMIDA-BEN, E. N., *et al.* Antibacterial screening of Origanum majorana L. oil from Tunisia. En: J. Essent. Oil Res. Vol 13 (2001); p 295-297. [149]

BLÁHA, V., *et al.* Bioanalysis of PUFA metabolism and lipid peroxidation in coronary atherosclerosis. En: J. Pharm. Biomed. Anal. Vol. 22 (2000); p. 563-572. [2]

BOELEN, M. H. The essential oil from Rosmarinus officinalis L. En: Perfum. Flav. Vol 10 (1985); p 21-37. Resumen en: LAWRENCE, B. M. Essential Oils 1981-1987. Illinois. Allured Publishing Corporation. 1989. p 180. [130]

BOTSOGLU, N. A., *et al.* Effect of dietary oregano essential oil on performance of chickens and on iron-induced lipid oxidation of breast, thigh and abdominal fat tissues. En: Br. Poultry Sci. Vol 43 (2002); p 223-230. [33]

BROWN, G., LEVIN, G. and MURPHY, S. Purine N-oxides. XII. Photochemical changes induced by ultraviolet radiation. En: Biochem. Vol. 3 (1964); p 880-883. [7]

CALDWELL, M. M., *et al.* Effects of increased solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems. En: J. Photochem. Photobiol. B. Vol 46 (1998); p 40-52. [15]

CERVANTES, M. Estudio de los metabolitos secundarios de salvia negra (Lepechinia Schiedeana) obtenidos por diferentes métodos de extracción y determinación de su

posible actividad antioxidante *in vitro*. Bucaramanga, 1999, 118 p. Trabajo de grado (Química). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. [44].

CHITRA, P., and MATHELA, C. S. Essential Oil composition of Origanum vulgare L. ssp vulgare from the Kumaon Himalayas. En: J. Essent. Oil Res. Vol 12 (2000); p 441-442. [120]

CHOI, H. S., et al. Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. En: J. Agric. Food Chem. Vol 48 (2000); p 4156-4161. [159]

CHOU, J. S. T. Analytical results on the volatile components of cardamon oil, caraway oil and coriander oil by gas chromatography, IR spectroscopy, etc. En: Koryo. Vol 106 (1974); p 55-60. Resumen En: LAWRENCE, B. M. Essential Oils 1979-1980. Illinois. Allured Publishing Corporation. 1981. p 26. [124]

CHU, N. and BIJUN, X. Evaluation of the antioxidant and pro-oxidant effects of tea catechin oxypolymers. En: J. Agric. Food Chem. Vol 48 (2000); p 6362-6366. [86]

COLEMAN, J.E., HAMPSON, J.W. and SAUNDERS, D.H. Autoxidation of fatty materials in emulsion. II. Factors affecting the histidine- catalyzed autoxidation of emulsified methyl linoleate. En: JAOCS II. Vol 41 (1964); p 347-351. [52]

CONTRERAS, N. Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* de algunos aceites esenciales en el proceso de peroxidación lipídica inducida por la radiación ultravioleta. Bucaramanga, 2002. Trabajo de grado (Maestría en Química). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. [143]

COOK, G. P., *et al*. The effects of secondary structure and O₂ on the formation of direct strand breaks upon UV irradiation of 5 bromodeoxy-uridine containing oligonucleotides. En: Chem. Biol. Vol. 6 (1999); p 451-459. [6]

CRISTIE, W. Advances in lipid methodology: two. Gran Bretaña. The oily press. 1993. p 76. [103]

DAMECHKI, M., SOTIROPOULOU, S. and TSIMIDOU, M. Antioxidant an pro-oxidant factors in oregano and rosemary gourmet olive oils. En: Grasas y Aceites. Vol 52 (2001); p 207-213. [94]

D'ANTUONO, L. F., GALLETTI, G. C. and BOCCHINI, P. Variability of essential oil content and composition of Origanum vulgare L. populations from a north mediterranean área (Liguria region, northern italy). En: Annals of Botany. Vol 86 (2000); p 471-478. [118]

DEFERERA, D. J., ZIOGAS, B. N. and POLISSIOU, M. G. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on Penicillium digitatum En: J. Agric. Food Chem. Vol 48 (2000); p 2576-2581. [155]

DELGADO, W. A. Evaluación en dos sistemas lipídicos modelo de la actividad antioxidante *in-vitro* de tres aceites esenciales extraídos de plantas pertenecientes a la familia Umbelliferae. Bucaramanga, 2002, 70 p. Trabajo de grado (Maestría en Química). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. [42]

DOBARGANES, M., RÍOS, J. and PÉREZ-CAMINO, M. Relaciones entre la composición de aceites vegetales y los componentes volátiles producidos durante su termoxidación. En: Grasas y Aceites. Vol 38 (1987); p 307-312. [104]

DORMAN, H. J. D., SURAI, P. and DEANS, S. G. *In vitro* antioxidant activity of a number of plant essential oils and phytoconstituents. En: J. Essent. Oil Res. Vol 12 (2000); p 241-248. [38]

EMMONS, CH., PETERSON, D. and PAUL, G. Antioxidant capacity of oat (Avena Sativa L) Extracts. 2. In vitro Antioxidant activity and contents of phenolic and tocol antioxidants. En: J. Agric. Food Chem. Vol 47 (1999); p 4894-4898. [28]

FADEL, H. H. M. and EL-MASSRY, K. F. Rosmarinus officinalis L. effect of drying on the volatile oil fresh leaves and antioxidant activity of their extracts. En: J. Essent. Oil-Bearing Plants. Vol 3 (2000); p 5-19. [35]

FARAG, R. S., ALÍ, M. N. and TAHA, S. H. Use of some essential oils as natural preservatives for butter. En: Grasas y Aceites. Vol 39 (1988); p 28-31. [39]

FERREIRA, M. Desarrollo y validación de un método para el análisis cuantitativo de compuestos carbonílicos, productos finales de degradación oxidativa de lípidos. Bucaramanga, 1997, 116 p. Trabajo de grado (Maestría en Química). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. [41]

FORMACEK, K. and KUBECZKA, K. H. Essential oils analysis by capillary chromatography and carbón-13 NMR spectroscopy. New York. J. Wiley & sons. 1982. Resumen en: LAWRENCE, B. M. Essential Oils 1981-1987. Illinois. Allured Publishing Corporation. 1989. p 100. [128].

FOTI, M., *et al*. Flavonoids, coumarins, and cinnamic acids as antioxidants in a micellar system. Structure-activity relationships. En: J. Agric. Food Chem. Vol 44 (1996); p 497-501. [49]

FRANKEL, E. N., HUANG, S. W. and KANNER, J. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oil vs emulsions. En: J. Agric. Food Chem. Vol 42 (1994); p 1054-1059. [47]

FUCHS, J. and PACKER, L. Oxidative stress in dermatology. New York. Marcel Dekker Inc. 1993. p 29, 49, 67. [75]

FUENTES, H. V. Monitoreo de la termodegradación de los ácidos grasos en los aceites vegetales de consumo humano, por medio de la cromatografía de gases de alta resolución y evaluación *in vitro* de la actividad antioxidante de productos naturales. Bucaramanga,

1999, 131 p. Trabajo de grado (Química). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. [43]

FOURNIER, G., *et al.* Etude de divers echantillons d'huile essentielle de romarin de Tunisie. En: Plant. Medic. Phytoth. Vol 23 (1989); p 180-185. Resumen en: LAWRENCE, B. M. Essential Oils 1988-1991. Illinois. Allured Publishing Corporation. 1993. p 136. [139]

GAMEL, T. H. and KIRITSAKIS, A. Effect of methanol extracts of rosemary and olive vegetable water on the stability of olive oil and sunflower oil. En: Grasas y Aceites. Vol 50 (1999); p 345-350. [26]

_____. Effect of phenolic extracts on trans fatty acid formation during frying. En: Grasas y Aceites. Vol 50 (1999); p 421-425. [92]

GIAMPERI, L., FRATERNALE, D. and RICCI, D. The *in vitro* action of essential oils on different organism. En: J. Essent. Oil Res. Vol 14 (2002); p 312-318. [145]

GIL, A. *et al.* Coriander essential oil composition from two genotypes grown in different environmental conditions. En: J. Agric. Food Chem. Vol 50 (2002); p 2870-2877. [142]

GORSIOU, P., NAXAKIS, G. and SKOULA, M. Diversity in the composition of monoterpenoids of Origanum microphyllum (Labiatae). En: Biochem. Syst. Ecol. Vol 30 (2002); p 865-879. [113]

GRAY, J. I. Measurement of lipid oxidation: a review. En: JAOCS. Vol 55 (1978); p 539. [98]

GUERRERO, T. M. and JOHNSON, C. B. Season has a major effect on the essential oil yield responde to nutrient supply in Origanum majorana. En: J. Hort. Sci. Biotechnol. Vol 75 (2000); p 520-527. [117]

GUPTA, G. K., DHAR, K. L. and ATAL, C. K. Chemical constituents of Coriandrum sativum L. seeds. En: Indian Perfum. Vol 21 (1977); p 86-90. Resumen en: LAWRENCE, B. M. Essential Oils 1981-1987. Illinois. Allured Publishing Corporation. 1989. p 24. [127]

GUTTERIDGE, J. M. C. and HALLIWELL, B. Antioxidants in nutrition, health and disease. Oxford. Oxford University Press. 1998. p 90-102. [1]

HADER, D. P., *et al*. Effects on aquatic ecosystems. En: J. Photochem. Photobiol. B. Vol 46 (1998); p 53-68. [14]

HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE, J. M. Free radicals in biology and medicine. New York. Oxford university press INC. 1989. p 22-81, 86-179, 188-266. [74]

HALVA, S., *et al*. Yield and glucosinolate of Mustard seeds and volatile oils of caraway seeds and coriander fruit III. Yield and volatile oils of coriander fruit (Coriandrum sativum L.). En: J. Agric. Sci. Finland. Vol 58 (1986); p 169-172. Resumen en: LAWRENCE, B. M. Essential Oils 1988-1991. Illinois. Allured Publishing Corporation. 1993. p 14. [131].

HAMID, A. and RAHMAN, A. Effect of copper and unsaturated fatty acids on the autoxidation of butter oil. En: Grasas y Aceites. Vol 26 (1975); p 293-295. [69]

HAMILTON R. J. and HAMILTON S. Lipid analysis: A practical approach. USA. IRL press, Oxford university press. 1992. p 47-48. [102]

HEATH, H.B. Source book of flavors. New York. Van Nostrand Reinhold. 1981. p 5-6. [96]

HENDERSON, D. E. and SLICKMAN, M. Quantitative HPLC determination of the antioxidant activity of capsaicin on the formation of lipid hydroperoxides of linoleic acid: a comparative study against BHT and melatonin. En: J. Agric. Food Chem. Vol 47 (1999); p 2563-2570. [100]

HIDALGO, F., ZAMORA, R. ALAIZ, M. Modificaciones producidas en las proteínas alimentarias por su interacción con lípidos peroxidados. I. Química radicalaria de los ácidos grasos poliinsaturados. En: Grasas y Aceites. Vol 42 (1991); p 379-386. [71]

HILDEBRAND, D. F., AFITLHILE, M. and FUKUSHIGE, H. Regulation of oxylipin synthesis. Lipids and signalling: oxylipins 2-further reactions for oxylipin production. En: Biochem. Soc. Trans. Vol 28 (2000); p 847-849. [83]

HORNE, D., *et al.* Antimicrobial effects of essential oils on Streptococcus pneumoniae. En: J. Essent. Oil Res. Vol 13 (2001); p 387-392. [148]

HOSHIKA, Y. Sensitive gas chromatographic determination of lower aliphatic carbonyl compounds as their pentapluorophenylhydrazones. En: J. Chromatogr. Vol 152 (1978); p 224-227. [109]

HOWELL, N. K. and SAEED, S. the effect of antioxidants on the production of lipid oxidation products and transfer of free radicals in oxidized. Online: <http://cabi-publishing.org/bookshop/readingroom/0851993346/3346ch4pdf>. [21]

HSIEH, R. J. and KINSELLA, J. E. Oxidation of polyunsaturated fatty acids: mechanisms, products, and inhibition with emphasis on fish. Academic Press Inc. 1989. p 233-335. [5].

HUANG, S. W., *et al.* Effect of pH on antioxidant activity of α -tocopherol and trolox in oil-in-water emulsions. En: J. Agric. Food Chem. Vol 44 (1996); p 2496-2502. [48]

_____. Antioxidant activity of alpha-tocopherol and trolox in different lipid substrates: bulk oil vs oil in water emulsions. En: J. Agric. Food Chem. Vol 44 (1996); p 444-452. [55]

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Animal and vegetable fats and oil- Analysys by gas chromatography of methyl esters of fatty acids. Geneve: ISO, 1990. 1-7 p. (ISO 5508). [156]

_____. Animal and vegetable fats and oil- Preparation of methyl esters of fatty acids. Geneve: ISO, 1978. 1-6 p. (ISO 5509). [157]

IRWANDI, J., MAN, B. and KITTS, D. Synergies between plant antioxidant blends in preventing peroxidation reactions in model and food oil systems. En: J. Am. Oil Chem. Soc. Vol 77 (2000); p 945-950. Resumen en: Chemicals Abstracts. Vol 133 (2000). [88]

JACOBSEN, C., *et al*. Partitioning of selected antioxidants in mayonnaise. En: J. Agric. Food Chem. Vol 41 (1999); p 3601-3610. [53]

JELÉN, H., OBUCHAUSKA, M. and ZAWIRSKA-WOJTASIAK, R. Headspace solid-phase microextraction use for the characterization of volatile compounds in vegetable oils of different sensory quality. En: J. Agric. Food Chem. Vol 48 (2000); p 2360-2367. [107]

KAZARINOVA, N. V., *et al*. Component composition and analysis of antibiotic activity of essential oil of Origanum Vulgare L. grown in certain regions of west Siberia. En: Rastitel'nye resursy. Vol 38 (2002); p 99-103. [141]

KOBAYASHI, K., *et al*. Gas chromatographic of low molecular weight carbonyl compounds in aqueous as their pentafluorophenylhydrazones. En: J. Chromatogr. Vol. 176 (1979); p 118-122. [110]

KOUL, A., BHATIA, V. and BANSAL, M. P. Effect of alpha-tcopherol on pulmonary antioxidant defence system and lipid peroxidation in cigarette smoke inhaling mice. Online: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1472-2091-2-14.pdf>. [27]

KUBECZKA, K. H. Progress in isolation techniques for essential oil constituents. Resumen en: SVENDSEN, A. B. and SCHEFFER, J. J. C. Essential oils and aromatic plants. Holanda. DR W. Junk Publishers. 1985. p 107-126. [158]

KUMAR, P., ANAND, P. and SANKHALKAR, S. Oxidative damage and changes in activities of antioxidant enzymes in wheat seedlings exposed to ultraviolet-B radiation. Online: <http://www.nsc.ernet.in/currsci/august/articles15.htm>. [11]

LAMIRI, A., *et al.* Insecticidal effects of essential oils against Hessian fly, Mayetiola destructor (say). En: Field crops Res. Vol 71 (2001); p 9-15. [152]

LAMPARSKY, D. and KLIMES, I. Heterocyclic trace components in the essential oil of coriander. En: Perfum. Flav. Vol 13 (1988; p 17-25. Resumen en: LAWRENCE, B. M. Essential Oils 1988-1991. Illinois. Allured Publishing Corporation. 1993. p 129. [132].

LASSANYI, Z. and LORINCZ, C., Test on terpenoids presents in parts of Coriandrum sativum L.III. Histology of the developing structures of Coriandrum sativum L. Var "Luc" and properties of volatile oils canals. En: Acta Agron. Acad. Scient. Hung. Vol 19 (1970); p 25-32. Resumen en: LAWRENCE, B. M. Essential Oils 1976-1978. Illinois. Allured Publishing Corporation. 1979. p 30. [134].

_____. Test on terpenoids presents in parts of Coriandrum sativum L.I. Thin-layer chromatographic examination of the volatile oil of pericarpium and seedling of the "Lucs" variety. En: Acta Agron. Acad. Scient. Hung. Vol 16 (1967); p 95-100. Resumen en: LAWRENCE, B. M. Essential Oils 1976-1978. Illinois. Allured Publishing Corporation. 1979. p 30. [133].

LAWRENCE, B. M. Essential Oils 1979-1980. Illinois. Allured Publishing Corporation. 1981. p 50. [126]

LIN, J. N. and KAO, C. H. Effect of oxidative stress caused by hydrogen peroxide on senescence of rice leaves. Online: <http://ejournal.sinica.edu.tw/bbas/content/1998/3/bot93-03.pdf>. [72]

LONGSTRETH, J., *et al.* Health risks. En: J. Photochem. Photobiol. B. Vol 46 (1998); p 20-39. [16]

MAARSE, H. and VAN OS, F. H. L. Volatile oil Origanum vulgare L. ssp. vulgare. III. Changes in composition during maturation. En: Flavour Ind. Vol 5 (1974); p 278-281. Resumen en: LAWRENCE, B. M. Essential Oils 1976-1978. Illinois. Allured Publishing Corporation. 1979. p 42. [123]

MACLEOD, A. J. and ISLAM, R. Volatile flavour components of coriander leaf. En: J. Sci. Food Agric. Vol 27 (1976); p 721-725. Resumen en: LAWRENCE, B. M. Essential Oils 1976-1978. Illinois. Allured Publishing Corporation. 1979. p 30. [135]

MADHAVI, D., DESHPANDE, S. and SALUNKHE, D. Food antioxidants: technological and health perspectives. New York. Marcel Dekker Inc. 1996. p 267-359. [22]

MAESTRO, R. and BORJA, R. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. En: Grasas y Aceites. Vol 44 (1993); p 101-106. [23]

MAESTRO, R., LEÓN, R. and RUIZ-GUTIERREZ, V. Los compuestos fenólicos en la autodefensa de los vegetales. En: Grasas y Aceites. Vol 44 (1993); p 365-369. [95]

MAKINEN, M. Lipid hydroperoxides: Effects of tocopherols and ascorbic acid on their formation and decomposition. Academic dissertation, University of Helsinki. Helsinki, 2002. Online: <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/maa/skemi/vk/makinen/lipidhyd.pdf>. [77]

MEDINA, I., SATUE-GRACIA, T. and GERMAN, B. Comparison of natural polyphenol antioxidants from extra virgin olive oil with synthetic antioxidants in tuna lipids during thermal oxidation. En: J. Agric. Food Chem. Vol 47 (1999); p 4873-4879. [90]

MEI, L., MCCLEMENTS, D. and DECKER, E. Lipid oxidation in emulsions as affected by charge status of antioxidants and emulsion droplets. En: J. Agric. Food Chem. Vol 47 (1999); p 2267-2273. [62]

MILOS, M., MASTELIC, J. and JERKOVIS, I. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (origanum vulgare L. ssp. Hirtum). En: Food Chem. Vol 71 (2000); p 79-83. [34]

MIN, D. B. and BOFF, J. M. Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. En: Comprehensive Reviews in food science and food safety. Vol 1 (2002); p 58-72. [80]

MOYA, M., MENDOZA, D. and AMEZQUITA, F. Analytical evaluation of polyunsaturated fatty acids degradation during thermal oxidation of edible oils by fourier transform infrared spectroscopy. En: Talanta. Vol 50 (1999); p 269-275. [99]

MUELLER, M. J. Radically Novel prostaglandins in animal and plants: the isoprostanes. En: Chem. Biol. Vol 5 (1998); p 323-333. [82]

MURPHY, M. Plants products as antimicrobial agents. En: Clinical microbiology Reviews. 1999. p 564-582. [112]

NORVAL, M. Effects solar radiation on the human immune system. En J. Photochem. Photobiol. B. Vol 63 (2001); p 28-40. [17]

OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Fatty Acids in Oils and Fats, preparation of Methyl Esters. Virginia-USA: AOAC, 1990. p 963-965. (AOAC, 965.33, 965.49, 963-965). [101]

ÔZCAN, M. and ERKMEN, O. Antimicrobial activity of the essential oils of Turkish plant spices. En: Eur. Food Res. Technol. Vol 212 (2001); p 658-660. [93]

PAILLOUS, N. and FERY-FORGUES, S. Interest of photochemical methods for induction of lipid peroxidation. En: Biochimie. Vol 76 (1994); p 355-368. [79]

PAPADOULOS, K., *et al.* Evaluation of food antioxidant activity by photostorage chemiluminescence. En: Anal. Chim. Acta. Vol 433 (2001); p 263-268. [66]

PEKKARINEN, S., STOCKMANN, H. and SCHWARZ, K. Antioxidant activity and partitioning of phenolic acids in bulk and emulsified methyl linoleate. En: J. Agric. Food Chem. Vol 47 (1999); p 3036-3043. [54]

PELLEGRINI, N., VISIOLI, F. and BURATTI, S. Direct analysis of total antioxidant activity of olive oil and studies on the influence of heating. En: J. Agric. Food Chem. Vol 49 (2001); p 2532-2538. [70]

PÉREZ, F. and PERMANYER, J. Estudio de las alteraciones termooxidativas de los aceites vegetales: aceite de oliva virgen y aceite de girasol refinado. En: Grasas y Aceites. Vol 37 (1986); p 29-32. [67]

PÉREZ-CAMINO, M., MÁRQUEZ-RUIZ, G. and DOBARGANES, M. Alteración de grasas usadas en frituras. I. Comportamiento de aceites de oliva y girasol en freidoras domésticas. En: Grasas y Aceites. Vol 38 (1987); p 307-312. [68]

PERINEAU, F., GANOU, L. and BESSIERE, J. M. Hydrodistillation du fruit de coriandre. En: Parfum. Cosmet. Arômes. Vol 98 (1991); p 79-84. Resumen en: LAWRENCE, B. M. Essential Oils 1988-1991. Illinois. Allured Publishing Corporation. 1993. p 183. [136]

PIZZALE, L., *et. al.*, Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of different Botanical origin. Online: [http:// www.richrom.com/ assets/ CD23PDF /m11.pdf](http://www.richrom.com/assets/CD23PDF/m11.pdf). [161]

POKORNY, J., YANISHLIEVA, N. and GORDON, M. Antioxidants in food: practical applications. Cambridge England. CRC Press, Woodhead publishing limited. 2001. p 1-380.

PONGINEBBI, L., NAWAR, W. and CHINACHOTI, P. Effect of relative humidity on lipid oxidation in freeze-dried emulsions. En: Grasas y Aceites. Vol 51 (2000); p 348-354. [3]

POTTER, T. L. Essential oil composition of cilantro. En: J. Agric. Food Chem. Vol 44 (1996); p 1824-1826. [137]

POVILAITYTÉ, V. and VENSKUTONIS, P. Antioxidative activity of purple peril (Perilla frutescens L.) Moldavian Dragon head (Dracocephalum moldavica L.) and Roman Chamomile (Anthemis nobilis L.) extracts in rapeseed oil. En: JAOCS. Vol 77 (2000); p 951-956. [91]

PRYOR, W. A., STRICKLAND, T. and CHURCH, D. Comparison of the efficiencies of several natural and synthetic antioxidants in aqueous sodium dodecyl sulfate micelle solutions. En: J. Am. Chem. Soc. Vol 110 (1988); p 2224-2229. [51]

PUERTAS, M. A., *et al.* *In vitro* radical scavenging activity of essential oils from columbian plants and fractions from oregano (Origanum vulgare L.) essential oil. En: Flavour Fragr. J. Vol 17 (2002); p 380-384. [31]

_____. Desarrollo de un método analítico para la determinación de compuestos carbonílicos volátiles y la evaluación de la posible actividad antioxidante *in vitro* de algunos productos naturales y sintéticos. Bucaramanga, 2002, 193 p. Trabajo de grado (Doctor en Química). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. [63]

REDPATH, J. L. Radical reactions with simple biochemical system. En: J. Chem. Edu. Vol 58 (1981); p 131. [10]

RHYU, H. Y. Gas chromatographic characterization of oregano and selected spices of labiatae family. En: J. Food Sci. Vol 44 (1979); p 1373-1378. Resumen en: LAWRENCE, B. M. Essential Oils 1981-1987. Illinois. Allured Publishing Corporation. 1989. p 61. [129]

RIEGO, M. and GÓMEZ, C. Química-Física interfacial de emulsificantes alimentarios. Parte I. Solubilidad e interacción con medios acuosos. En: Grasas y Aceites. Vol 39 (1988); p 44-51. [58]

_____. Solubilidad de emulsionantes alimentarios lipófilos en medios acuosos. I. Sistemas formados por agua, etanol y tensoactivos derivados de sorbitano. En: Grasas y Aceites. Vol 38 (1987); p 313-317. [57]

ROBERTS, D., POLLIEN, P. and MILO, C. Solid phase microextraction method development for headspace analysis of volatile flavor compounds. En: J. Agric. Food Chem. Vol 48 (2000); p 2430-2437. [106]

ROBINS, M. Lipid emulsions. En: Grasas y Aceites. Vol 51 (2000); p 26-34. [60]

ROGINSKY, V. A., *et al.* Moderate antioxidative efficiencies of flavonoids during peroxidation of methyl linoleate in homogeneous and micellar solutions. En: JAOCS. Vol 73 (1996); p 777-786. [50]

ROSUA, J. L. and GARCIA-GRANADOS, A. Analyse des huiles essentielles d'especes du genre Rosmarinus L. et leur interet entant que caractere taxonomique. En: Plant. Med. Phythotherap. Vol 21 (1987); p 138-143. Resumen en: LAWRENCE, B. M. Essential Oils 1988-1991. Illinois. Allured Publishing Corporation. 1993. p 50. [138]

RUBERTO, G., *et al.* Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from Algerian Origanum glandulosum Desf. En: Flavour Fragr. J. Vol 17 (2002); p 251-254. [32]

SALGAR, W. Evaluación en dos sistemas lipídicos modelo de la actividad antioxidante *in vitro* de aceites esenciales extraídos de las plantas pertenecientes a la familia Labiatae. Bucaramanga, 2002, 79 p. Trabajo de grado (Maestría en Química). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. [142]

SÁNCHEZ, M. C., et al. Evolución de la cinética de emulsificación y de las propiedades reológicas de emulsiones aceite vegetal en agua preparadas con dos tipos de agitadores. En: Grasas y Aceites. Vol 52 (2001); p 222-228. [56]

SCHEFFER, J. J. C., et al. The essential oils of three *Origanum* species grown in turkey. En: In progress in essential Oil Research. Berlín. E. J. Brunke, Walter de Gruyter. 1986. Resumen en: LAWRENCE, B. M. Essential Oils 1988-1991. Illinois. Allured Publishing Corporation. 1993. p 45. [140]

SCHWARZ, K., et al. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. En: Eur. Food Res. Technol. Vol 212 (2001); p 319-328. [24]

_____. Activities of antioxidants are affected by colloidal properties of oil in water and water-in-oil emulsions and bulk oils. En: J. Agric. Food Chem. Vol 48 (2000); p 4874-4882. [46]

SCHWENKER, G. and KLÖHN, W. Gas-chromatographische Untersuchungen über die Zusammensetzung von Rosmarinölen. En: Arch. Pharm. Vol 296 (1963); p 845-854. Resumen en: LAWRENCE, B. M. Essential Oils 1976-1978. Illinois. Allured Publishing Corporation. 1979. p 34. [122]

SHAHIDI, F. Natural phenolic antioxidants and their food applications. En: Lipid Technol. Vol 12 (2000); p 80-84. Resumen en: Chemicals Abstracts. Vol 133 (2000). [89]

SHERWIN, E. R. Oxidation in fat and oil processing. En: JAOCS. Vol 55 (1978); p 809-814. [65]

SHIOWY, W. and HONG, J. Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen. En: J. Agric. Food Chem. Vol 48 (2000); p 5677-5684. [87]

SIEH, R. J. and KINSELLA, J. E. Oxidation of polyunsaturated fatty acids: Mechanisms, products, and inhibition with emphasis on fish. Advances in food and nutrition research. Academic press, Inc. 1989. p 233-335. [81]

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. San Diego. Academic press. 1991. p 57-79, 259-267, 319-332, 399-416. [18]

SIMIC, M. G. Free radical mechanisms in autoxidation processes. En: J. Chem. Edu. Vol 58 (1981); p 125. [20]

SIMIC, M. G. and KAREL, M. Autoxidation in food and biological systems. New York. Plenum Press. 1980. p 261-282. [4]

SKANDAMIS, P., *et al.* Inhibition of oregano essential oil and EDTA on Escherichia coli O157:H7. En: Ital. J. Food Sci. Vol 13 (2001); p 65-75. [153]

SKRUBIS, G., Seven wild aromatic plants growing in Greece and their essential oils. En: Flavour Ind. Vol 3 (1972); p 571, 566-568. Resumen En: LAWRENCE, B. M. Essential Oils 1979-1980. Illinois. Allured Publishing Corporation. 1981. p 50. [125]

SNYDER, J. M., FRANKEL, E. and SELKE, E. Gas chromatographic analyses of headspace volatiles from vegetable oil. En: JAOCS. Vol 62 (1985); p 12. [105]

SONG, J. M., MILLIGAN, J. R. and SUTHERLAND, B. M. Bistranded oxidized purine damage clusters: induced in DNA by long-wavelegth Ultraviolet (290-400 nm) radiation?. En: Biochem. Vol 41 (2002); p 8683-8688. [8]

STASHENKO, E. E., *et al.* Solid-phase microextraction with on-fibre derivatisation applied to the analysis of volatile carbonyl compounds. En: J. Chromatogr. A. Vol 886 (2000); p 175-181. [45]

STOREY, K. B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. En: Brazilian Journal of Medical and Biological Research. Vol 29 (1996); p 1715-1733. [76]

STRATTON, S. P. and LIEBLER, D. C. Determination of singlet oxygen-specific versus radical-mediated lipid peroxidation in photosensitized oxidation of lipid bilayers: effect of β carotene and α -tocopherol. En: Biochem. Vol 36 (1997); p 12911-12920. [78]

SU, Y., *et al.* Antioxidant activity of flavonoids isolated from Scutellaria rehderiana. En: JAOCS. Vol 77 (2000); p 807-812. [29]

TASKINEN, J. and NYKÄNEN, L. Volatile constituents obtained by the extraction with alcohol-water mixture and by steam distillation of coriander fruit. En: Acta Chem. Scand. Vol 29 (1975); p 425-429. Resumen en: LAWRENCE, B. M. Essential Oils 1976-1978. Illinois. Allured Publishing Corporation.1979. p 30. [121]

TKACHENKO, K. G. and TKACHEV, A. V. Component composition of the essential oil of Origanum vulgare L. Grow in Leningrade region: En Rastitel'nye Resursy. Vol 38 (2002); p 97-101. [114]

THYRION, F. The production of natural antioxidants (other vitamin E). Lipid Synth. Manuf. Sheffield academic press. 1999. p 268-287. Resumen en: Chemicals Abstracts. Vol 132 (2000). [84]

TIWARI, K. Natural product antioxidants and their therapeutic potential in mitigating peroxidative modification of lipoproteins and atherosclerosis: recent development. En: J. Med. Aromat. Plant Sci. Vol 21 (1999); p 730-741. Resumen en: Chemicals Abstracts. Vol 133 (2000). [85]

TRABOULSI, A. F., *et al.* Insecticidal properties of essential plant oils against the mosquito Culens pipiens molestus (Diptera: culicidae). En: Pest manage. Sci. Vol 58 (2002); p 491-495. [146]

TUNC, I., *et al.* Ovicidal activity of essential oils from five plants against two stored-product insects. En: J. Stored Prod. Res. Vol 36 (2000); p 161-168. [154]

VALENZUELA, A. and NIETO, S. Synthetic and natural antioxidants: food quality protectors. En: Grasas y Aceites. Vol 47 (1996); p 186-196. [19]

VAN RUTH, S., ROOZEN, J. and POSTHUMUS, M. Volatile composition of sunflower oil-in-water emulsions during initial lipid oxidation: influence of pH. En: J. Agric. Food Chem. Vol 47 (1999); p 4365-4369. [61]

WALL, J. Antioxidants in prevention of reperfusion damage of vascular endothelium. Online: <http://www.tcd.ie/tsmj/2000/2000pdf/antiox.pdf>. [9]

WARD, J. F. Radiolytic damage to genetic material. En: J. Chem. Edu. Vol 58 (1981); p 135. [12]

WIDYARINI, S., *et al.* Isoflavonoid compounds from red clover (Trifolium pratense) protect from inflammation and immune suppression induced by uv radiation. En: Photochem. Photobiol. Vol 74 (2001); p 465. [25]

WILLIAMS, W. B., COVELIER, M. E. and BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. En: Lebensm.-Wiss. U.-Technol. Vol 28 (1995); p 25-30. [160]

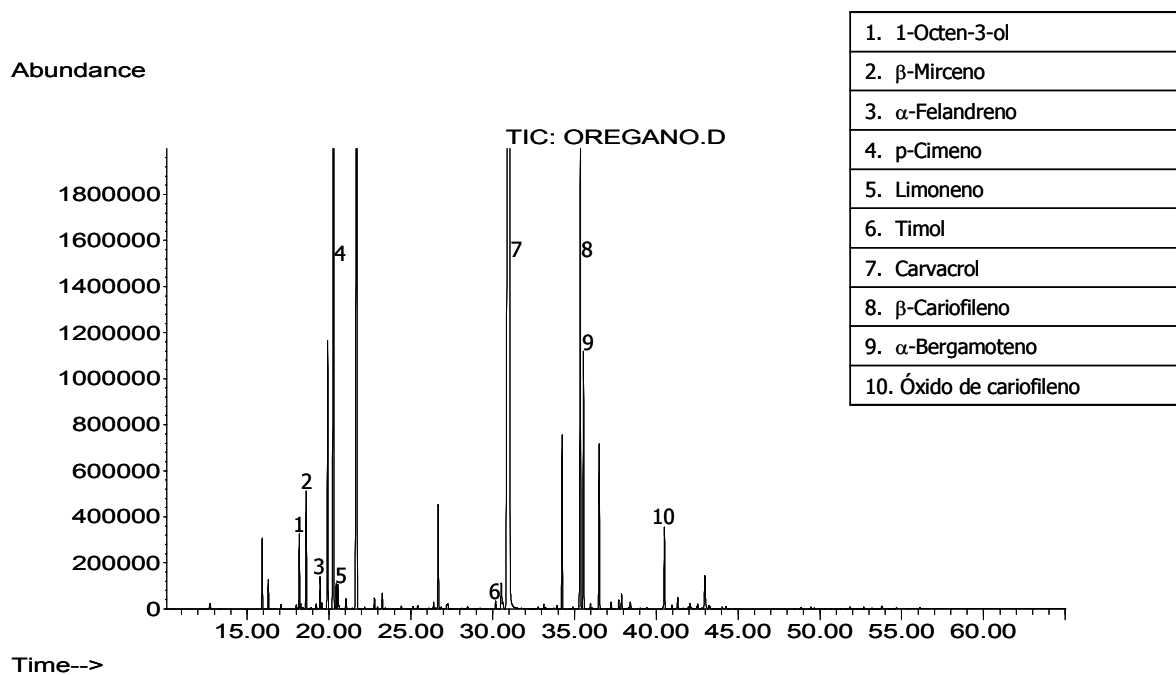
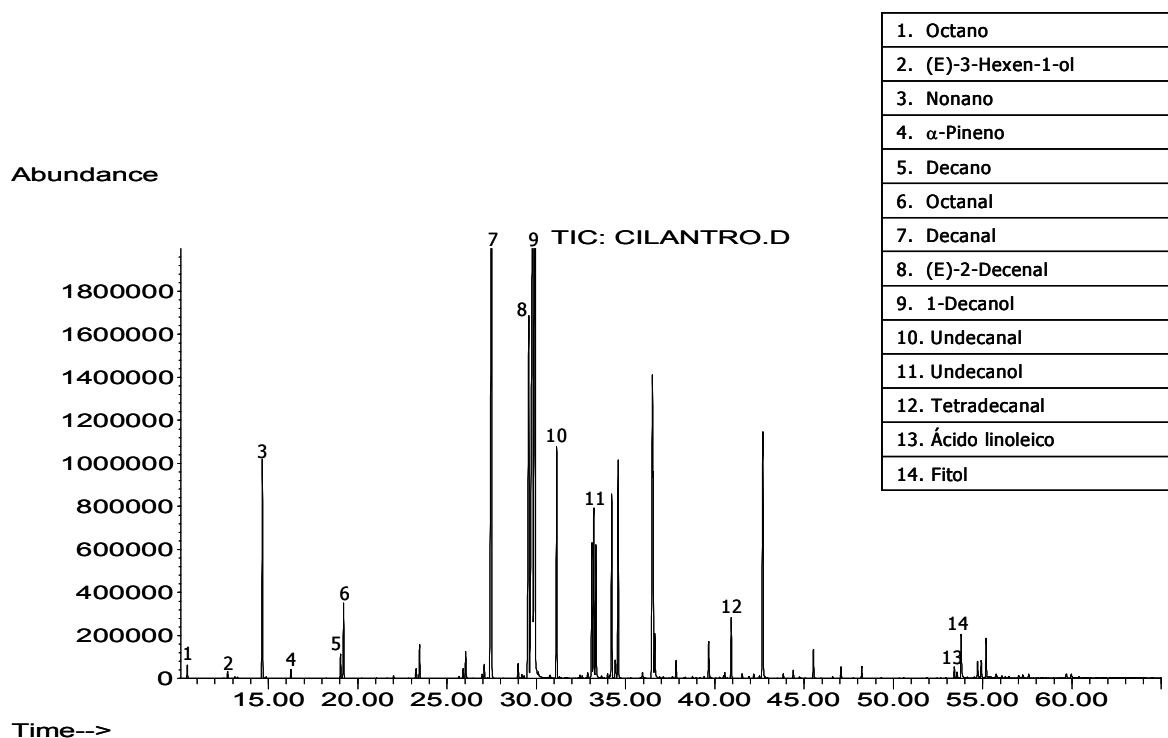
WU, H. and LIN, J. Determination of aldehydic lipid peroxidation products with dabsyl hydrazine by high-performance liquid chromatography. En: Anal. Chem. Vol 67 (1995); p 1603-1612. [108]

YILDIRIM, I. and ÔZCAN, M. Use of oregano and cumin essential oils as disinfectant on hatching quail eggs. En: Hayvancilik Arastirma Dergisi. Vol 11 (2001); p 61-63. [147]

ZYGADLO, J., *et al*. Empleo de aceites esenciales como antioxidantes naturales. En: Grasas y Aceites. Vol 46 (1995); p 285-288. [40]

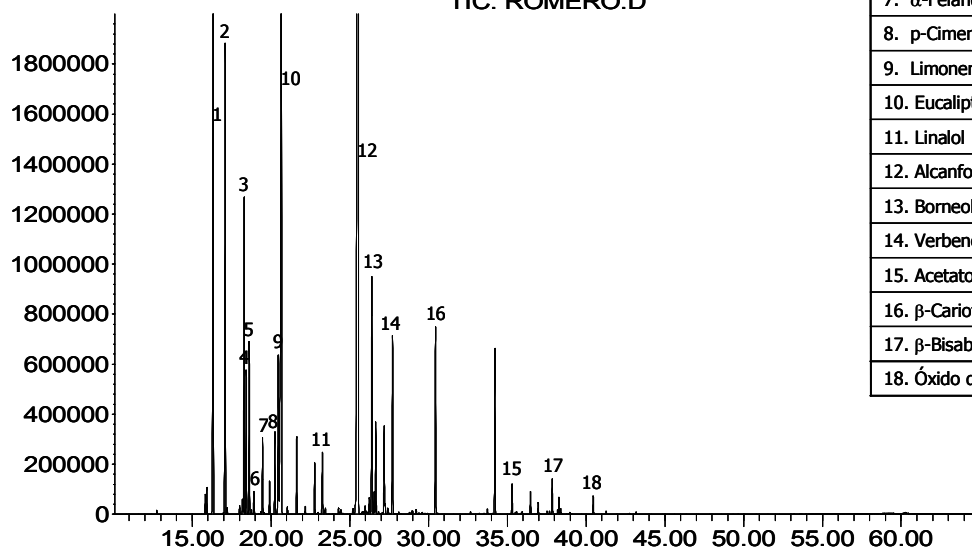
ANEXO 1

CROMATOGRAMAS (TIC) DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Coriander sativum* L.,
Origanum vulgare L. y *Rosmarinus officinalis* L. OBTENIDOS POR HRGC-MSD



Abundance

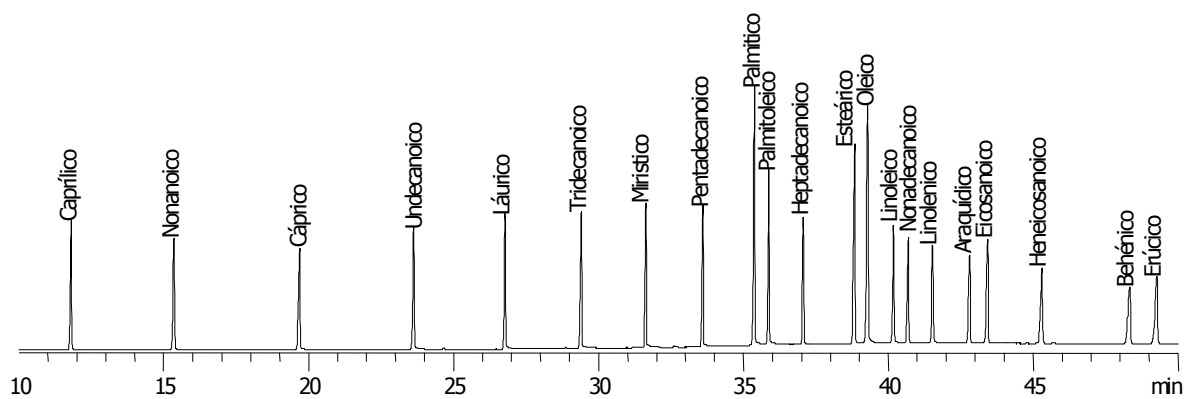
TIC: ROMERO.D



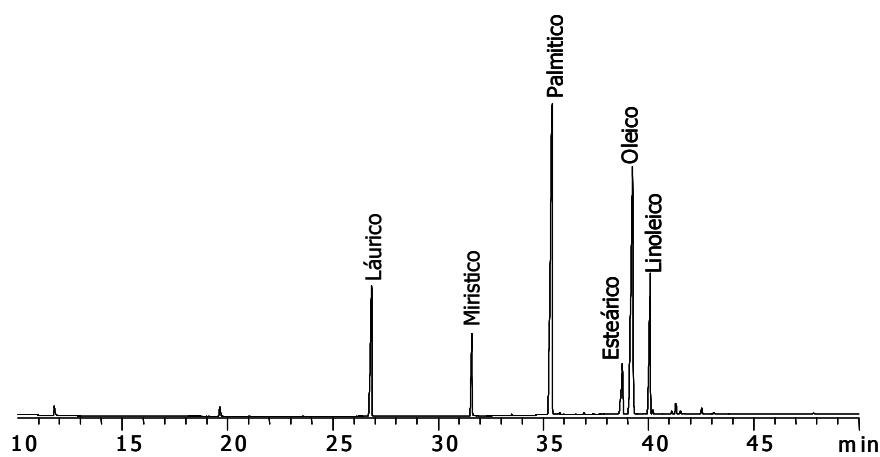
Time-->

ANEXO 2

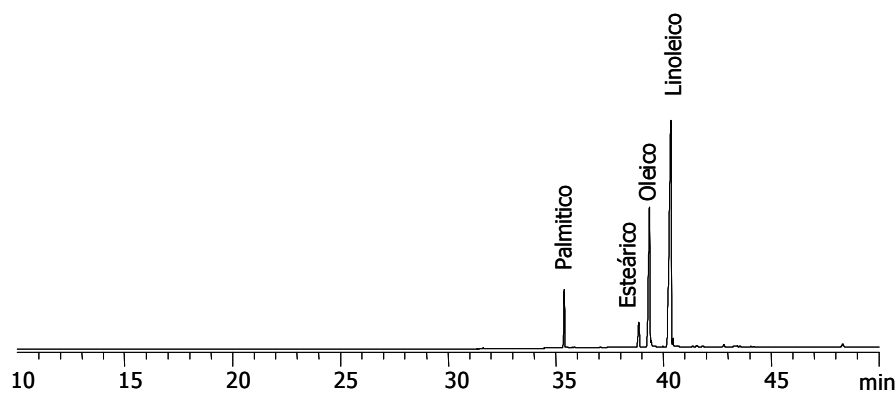
ÁCIDOS GRASOS PRESENTES EN MEZCLA PATRÓN, ACEITE VEGETAL "GOURMET" Y
MARGARINA "SABRINA"



Mezcla patrón de ésteres metílicos de ácidos grasos



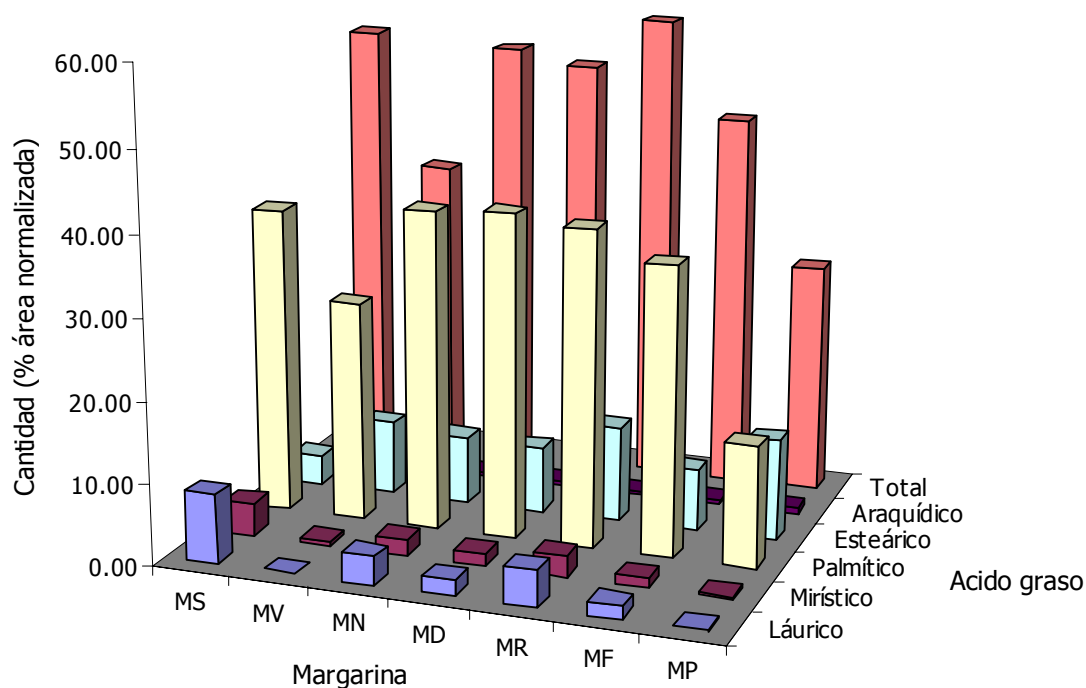
Ácidos grasos presentes en la margarina "Sabrina".



Ácidos grasos presentes en el aceite vegetal "Gourmet"

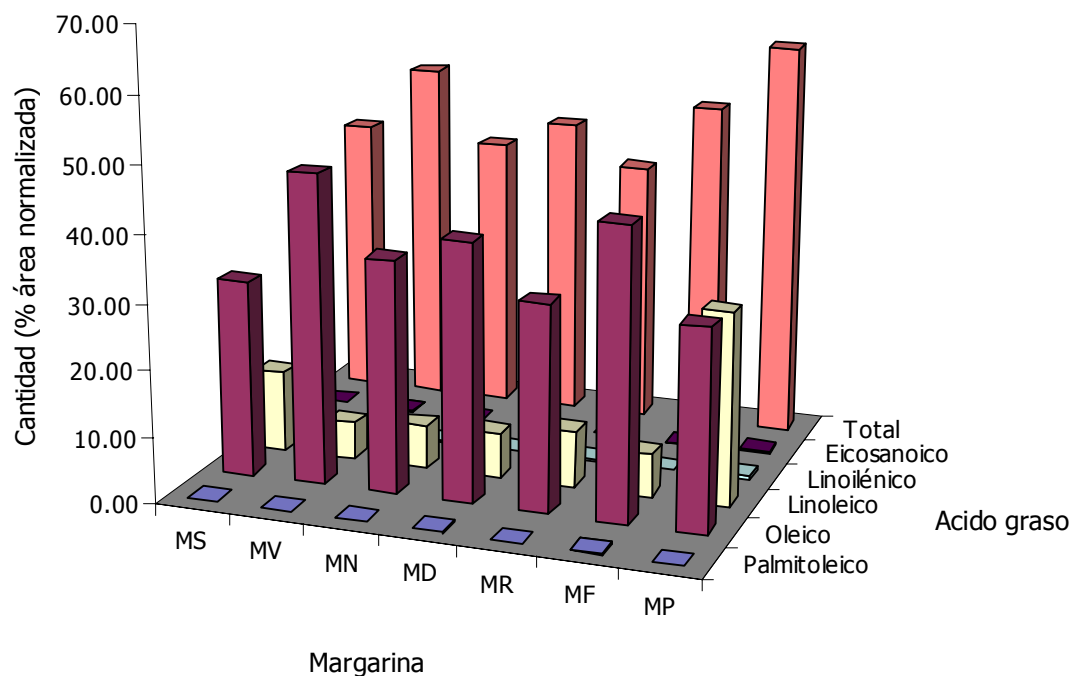
ANEXO 3

ÁCIDOS GRASOS PRESENTES EN ALGUNAS MARGARINAS Y ACEITES VEGETALES
COMERCIALES



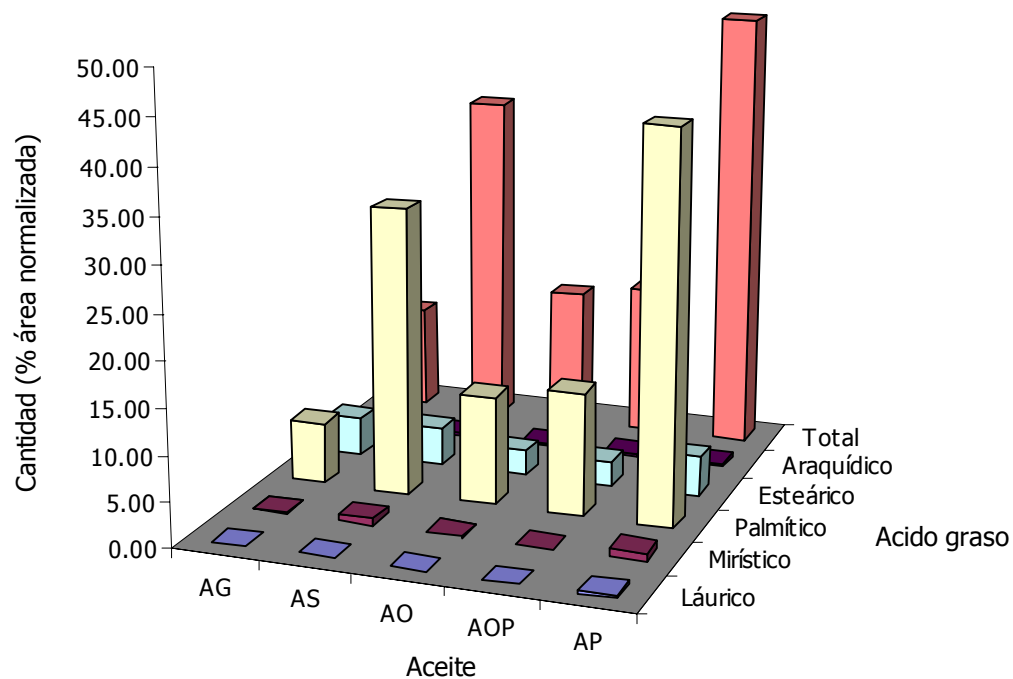
Margarina	Acidos grasos saturados (% área normalizada)					Total
	Láurico	Mirístico	Palmítico	Esteárico	Araquídico	
MS	8.69	4.11	38.17	3.81	0.47	55.25
MV	0.17	0.56	27.37	9.35	0.53	37.98
MN	3.50	2.09	39.72	8.44	0.48	54.23
MD	2.00	1.57	40.32	8.19	0.49	52.57
MR	4.54	2.60	39.25	12.04	0.47	58.90
MF	1.65	1.32	35.82	7.79	0.49	47.07
MP	0.20	0.28	15.06	12.63	0.72	28.89

MS= margarina "Sabrina", MV= margarina "Mavesa", MN= margarina "Natura", MD= margarina "Dagusto", MR= margarina "Rama", MF= margarina "Fina", MP= margarina "Premier".



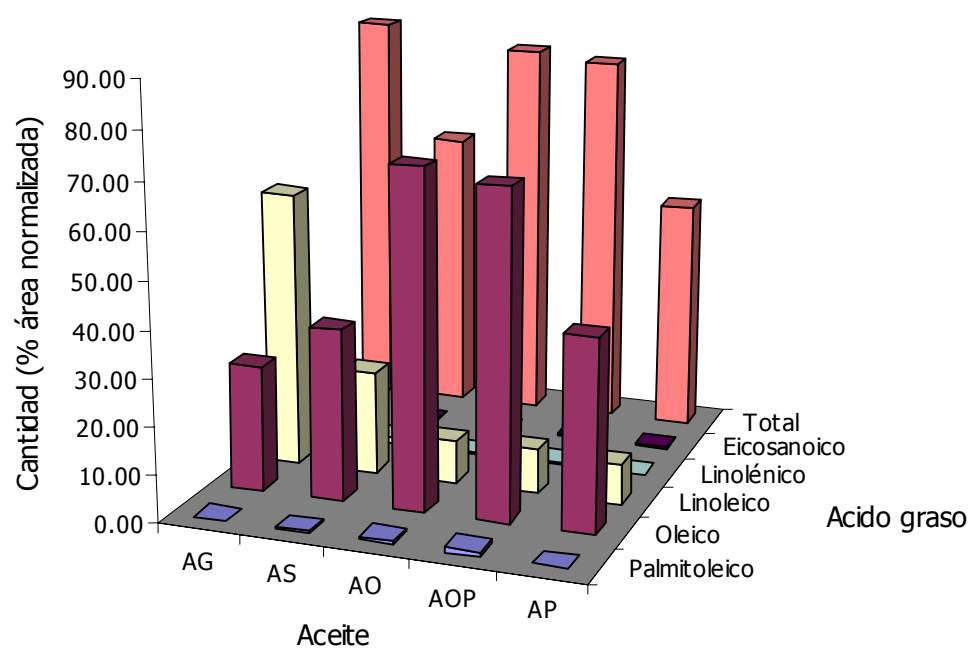
Margarina	Acidos grasos insaturados (% área normalizada)					
	Palmitoleico	Oleico	Linoleico	Linoilénico	Eicosanoico	Total
MS	0.09	29.87	12.34	0.55	0.27	43.12
MV	0.10	47.03	5.76	0.15	0.10	53.14
MN	0.10	35.32	6.60	0.12	0.06	42.20
MD	0.11	39.13	6.79	0.12	0.09	46.24
MR	0.11	31.30	8.47	0.21	0.10	40.19
MF	0.10	43.84	6.46	0.09	0.10	50.59
MP	0.09	30.39	29.13	0.51	0.41	60.53

MS= margarina "Sabrina", MV= margarina "Mavesa", MN= margarina "Natura", MD= margarina "Dagusto", MR= margarina "Rama", MF= margarina "Fina", MP= margarina "Premier".



Aceite	Acidos grasos saturados (% área normalizada)					
	Láurico	Mirístico	Palmítico	Esteárico	Araquídico	Total
AG	0.00	0.08	6.86	4.28	0.28	11.50
AS	0.18	0.70	31.81	4.29	0.36	37.34
AO	0.00	0.03	12.12	2.86	0.41	15.42
AOP	0.00	0.02	13.66	2.73	0.39	16.80
AP	0.28	0.93	42.88	4.54	0.35	48.98

AG = aceite "Gourmet", AS = aceite "Oleocali", AO = aceite de oliva refinado, AOP = aceite de oliva sin refinar, AP = aceite de palma

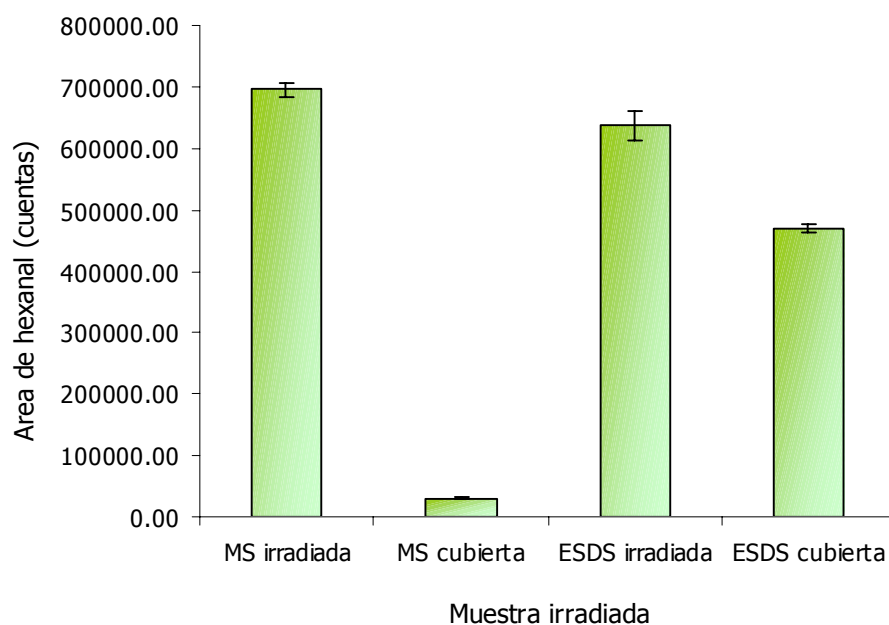


Aceite	Acidos grasos insaturados (% área normalizada)					
	Palmitoleico	Oleico	Linoleico	Linolénico	Eicosanoico	Total
AG	0.12	27.03	59.16	0.23	0.15	86.69
AS	0.25	36.68	22.26	1.76	0.17	61.12
AO	0.78	71.69	9.24	0.56	0.30	82.57
AOP	1.02	69.32	9.64	0.64	0.29	80.91
AP	0.14	40.99	8.63	0.15	0.15	50.06

AG = aceite "Gourmet", AS = aceite "Oleocali", AO = aceite de oliva refinado, AOP = aceite de oliva sin refinar, AP = aceite de palma

ANEXO 4

DEGRADACIÓN DE LAS EMULSIONES DE MARGARINA "SABRINA" Y DE DODECIL
SULFATO DE SODIO, CON Y SIN PROTECCIÓN DE LA RADIACIÓN UVA-VISIBLE



Nombre	$\bar{X}^*$	s	CV, %
MS irradiada	695026	12542	1.8
MS cubierta	30037	2146	7.2
ESDS irradiada	637024	23958	3.8
ESDS cubierta	469591	6850	1.5

MS irradiada: margarina "Sabrina" irradiada, MS cubierta: margarina "Sabrina" cubierta con papel aluminio, ESDS irradiada: emulsión con dodecil sulfato de sodio irradiada, ESDS cubierta: emulsión con dodecil sulfato de sodio cubierta con papel aluminio.

$\bar{X}$: promedio de tres mediciones

s : desviación estándar

%CV = desviación estándar relativa o coeficiente de varianza

ANEXO 5

CROMATOGRAMAS DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS A PARTIR DEL ACEITE ESENCIAL DE
ORÉGANO, POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

