

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS ACEITES
ESENCIALES Y EXTRACTOS DE TRES QUIMIOTIPOS DE *Lippia origanoides*,
POR LOS MÉTODOS TEAC Y ORAC, Y SU EFECTO PROTECTOR EN UNA
MATRIZ PORTADORA DE VITAMINA F (ACEITE DE SEJE)**

LAURA GISELA GUARGUATÍ GUARGUATÍ

ALEJANDRA GONZÁLEZ HURTADO

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2013

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS ACEITES
ESENCIALES Y EXTRACTOS DE TRES QUIMIOTIPOS DE *Lippia organoides*,
POR LOS MÉTODOS TEAC Y ORAC, Y SU EFECTO PROTECTOR EN UNA
MATRIZ PORTADORA DE VITAMINA F (ACEITE DE SEJE)**

LAURA GISELA GUARGUATÍ GUARGUATÍ

ALEJANDRA GONZÁLEZ HURTADO

**Trabajo de grado presentada para optar al título de
Químico**

Directores:

ELENA E. STASHENKO, Química, Ph.D.

JAIRO RENÉ MARTÍNEZ, Químico, Ph.D.

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2013

DEDICATORIA

Quiero dedicarle este proyecto de investigación, a mi madre, mi nona, mis tías, mi prima chavis, mi madrina Elvia y mi madrina Dora, por sus enseñanzas, apoyo incondicional y consejos que me motivaron a culminar con éxito esta etapa.

Laura Gisela Guarguatif Guarguatif

A través del amor y el apoyo inagotable por parte de mi familia, culmino otra etapa más de mi vida. A mi padre, Juan Guillermo, mi madre Margarita y mi hermana, Manuela; dedico este triunfo.

Alejandra González Hurtado

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme permitido culminar esta etapa profesional y haberme dado salud para lograr mis objetivos.

A mi madre Esperanza por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por ser una de las principales motivaciones en mi vida, y el ejemplo más grande de perseverancia y constancia que tengo; pero más que nada por su amor, paciencia y comprensión.

A mi nona Alicia, a mi tía Cecilia y a mi tío Álvaro, por ser el primer ejemplo de familia; por inculcarme el valor para salir adelante; por el amor y el respeto con el cual crecí rodeada y por el hecho de que nunca me hizo falta nada.

A mi hermanita menor Isabella que siempre ha llenado de felicidad todos los momentos que he compartido con ella y a mi tía Azucena por su apoyo constante.

A mis madrinas Elvia y Dora, que siempre confiaron en mí y nunca faltaron cuando más necesite de su ayuda.

A mis demás familiares porque directa o indirectamente contribuyeron a culminar esta etapa profesional con éxito.

A la Dra. Elena Stashenko y al Dr. Jairo René Martínez, por haber confiado en mí, por la paciencia, los consejos, por sus valiosas enseñanzas y sobre todo por la dirección de este trabajo.

Laura Gisela Guarguati Guarguati

AGRADECIMIENTOS

Hay todo un sentimiento de gratitud hacia Dios por ser la pauta permanente para distinguir el valor del trabajo hecho con dedicación y el precio de contar con personas que enriquecen contantemente mi espíritu.

Agradezco a mi familia, amigos y compañeros más cercanos por permitirme crecer personal y profesionalmente, y que además, contribuyeron en la formación de mi carácter. Por eso, quiero agradecer a las personas que aportaron con sus conocimientos, apoyo, presencia, confianza y amor para el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Elena E. Stashenko y al Dr. Jairo René Martínez, por estar dispuestos a contribuir con sus aportes siempre acertados y su apoyo en la realización de mi proyecto de grado, además, por la paciencia otorgada. Al CENIVAM, al Laboratorio de Cromatografía, a la Escuela de Química y a la Universidad Industrial de Santander, por el apoyo científico y económico brindado.

Alejandra González Hurtado

TABLA DE CONTENIDO

	INTRODUCCIÓN	22
1	ESTADO DEL ARTE	24
1.1	<i>Lippia origanoides</i>	24
1.2	ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS	25
1.3	COMPUESTOS FENÓLICOS	26
1.3.1	Flavonoides	27
1.4	MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS	29
1.4.1	Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHHD)	29
1.4.2	Extracción con solvente	30
1.5	SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS	30
1.5.1	Cromatografía de gases	30
1.5.2	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	31
1.5.3	Cromatografía líquida de alta eficiencia	32
1.6	PRODUCTOS COSMÉTICOS	32
1.6.1	Definición de productos cosméticos	32
1.6.2	Cosmecéuticos	33
1.6.3	Causa del deterioro de los cosméticos	34
1.7	ACEITE DE SEJE	34
1.8	ANTIOXIDANTES	36
1.9	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	38
1.9.1	Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS ⁺ o TEAC	39
1.9.2	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno	40
1.9.3	Peroxidación lipídica	41

2.	CIENCIOMETRÍA	46
3.	DESARROLLO EXPERIEMETAL	51
3.1	REACTIVOS, SOLVENTES Y MATERIAL DE REFERENCIA CERTIFICADO	51
3.1.1	Reactivos	51
3.1.2	Material vegetal	51
3.2	OBTENCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS POR MWHD	52
3.3	OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS CON SOLVENTE	53
3.4	ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO	53
3.4.1	Análisis por GC-MS	53
3.4.2	Análisis por GC-FID	55
3.4.3	Análisis por HPLC-DAD	57
3.4.4	Análisis de ácidos grasos (FAME)	58
3.5	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS	59
3.5.1	Evaluación de la capacidad antirradicalaria de los AE y extractos de <i>L. origanoides</i>	59
3.5.1.1	TEAC o ensayo de decoloración del catión-radical ABTS ⁺	60
3.5.1.2	Capacidad de absorción del oxígeno radical	62
3.5.2	Peroxidación lipídica	62
3.5.2.1	Análisis por GC-ECD del derivado PFPH-hexanal	63
3.5.2.2	Calibración externa del derivado PFPH del hexanal	64
3.5.2.3	Peroxidación lipídica en el aceite de seje sometido a radiación UV	65
3.5.2.4	Evaluación de la capacidad antioxidante <i>in vitro</i> de los AE y extractos de <i>L. origanoides</i> , quimiotipos timol, carvacrol y felandreno, en el aceite de seje sometido a radiación UV.	66
3.5.2.5	Validación del sistema lipídico modelo	67

4	ANÁLISIS DE RESULTADOS	68
4.1	RENDIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Lippia origanoides</i>	68
4.2	CARACTERIZACIÓN GENERAL DE LOS ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS	69
4.2.1	Identificación de los metabolitos secundarios volátiles de <i>Lippia. origanoides</i> , aislados por MWHHD	69
4.2.2	Identificación de flavonoides aislados por extracción con solvente	78
4.3	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS	80
4.3.1	Comparación de la capacidad antirradicalaria de los AE y extractos le <i>Lippia origanoides</i> quimiotipos timol, carvacrol y felandreno	80
4.3.1.1	TEAC o ensayo de decoloración del catión-radical ABTS ⁺	82
4.3.1.2	Capacidad de absorción del oxígeno radical (ORAC)	84
4.3.2	Análisis del contenido de ácidos grasos en el aceite de seje	91
4.3.3	Evaluación de la capacidad antioxidante <i>in vitro</i> de los AE y extractos en un sistema lipídico	92
	CONCLUSIONES	100
	RECOMENDACIONES	102
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
	ANEXOS	125

LISTA DE FIGURAS

		Pág
Figura 1	<i>Lippia origanoides</i> cultivada en CENIVAM-UIS, Bucaramanga.	24
Figura 2	Estructura básica y ejemplos de flavonoides	28
Figura 3	Especie <i>Oenocarpus bataua</i>	35
Figura 4	Estructuras químicas de algunos antioxidantes sintéticos usados en alimentos y cosméticos. BHA: Butil-hidroxianisol; BHT: Butil-hidroxitolueno; TBHQ: <i>ter</i> -butilhidroquinona; PG: Galato de propilo.	37
Figura 5	Estructura química del catión-radical ABTS ⁺ .	40
Figura 6	Estructura química de la fluorescina.	41
Figura 7	Formación de radicales de ácidos grasos (R [·]) por abstracción de un hidrógeno H [·] , iniciadas por ERO o cualquier RL.	43
Figura 8	Estabilización de los radicales de ácidos grasos (R [·]) por medio de rearrreglos intramoleculares y formación de peróxidos por reacción de estos radicales con oxígeno.	43
Figura 9	Ataque de un radical peróxido (ROO [·]) a una molécula vecina, abstracción de H [·] y propagación de la reacción en cadena.	43
Figura 10	Formación de radicales alcoxi (RO [·]) en presencia de metales divalentes, durante la finalización de peroxidación lipídica.	44
Figura 11	Productos finales generados durante el proceso de peroxidación lipídica.	44
Figura 12	Generación del hexanal durante la oxidación del ácido linoléico; A. Formación de hidroperóxidos a partir de la oxidación del ácido linoléico; B. Formación del hexanal, mediante la escisión β- del 13-hidroperóxido.	45

Figura 13	Número de artículos científicos publicados en diferentes áreas de investigación, sobre aceites esenciales y extractos vegetales como antioxidantes en cosméticos.	47
Figura 14	Número de publicaciones por año sobre los AE y extractos vegetales en cosméticos	48
Figura 15	Montaje de hidrodestilación asistida por la radiación de microondas.	53
Figura 16	Cromatógrafo de gases <i>Agilent Technologies 6890 Series GC System</i> , acoplado a un detector selectivo de masas <i>Agilent Technologies 5973 Network</i> , equipado con un puerto de inyección <i>split/splitless</i> y un inyector automático <i>Agilent 7863 Series</i> .	54
Figura 17	Cromatógrafo de gases <i>Agilent Technologies 6890N (Agilent, Palo Alto, California, EE.UU.)</i> , acoplado a un detector de ionización en llama (FID), equipado con un puerto de inyección <i>split/splitless</i> y un inyector automático <i>Agilent 7683B Series</i> .	57
Figura 18	Cromatógrafo <i>Agilent Technologies 1200</i> , con bomba cuaternaria <i>Agilent Technologies G1354A</i> , equipado con inyector automático y acoplado a un detector UV-Vis de arreglo de diodos <i>G1315B</i> .	58
Figura 19	Lector de microplacas <i>Turner Biosystems Inc., Modulus™ II Microplate Multimode Reader</i> , con microplacas de poli(estireno) de 96 pozos, que se encuentra equipado con módulos de absorbancia UV-Vis y fluorescencia (<i>Sunnyvale, CA, EE.UU.</i>).	60
Figura 20	Cromatógrafo de gases <i>Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, EE.UU.)</i> , <i>HP 6890 Plus</i> , acoplado a un detector de captura de electrones (ECD, ^{63}Ni), equipado con puerto de inyección <i>split/splitless</i> .	63
Figura 21	Reactor UV, equipado con un refrigerante y 6 lámparas fluorescentes <i>F6T5BLB</i> de 16 x 225.1 mm y 6 Watt.	65

Figura 22	Rendimientos de los AE obtenidos por MWHD, de los tres quimiotipos de <i>Lippia origanoides</i> bajo estudio, colectados en el Complejo Agroindustrial Piloto CENIVAM.	69
Figura 23	Perfil cromatográfico típico del AE de <i>L. origanoides</i> , quimiotipo timol, obtenido por MWHD. Columna DB-5 (60 m). <i>Split</i> 1:30. La identificación de los picos aparece en la Tabla 2 .	71
Figura 24	Perfil cromatográfico típico del AE de <i>L. origanoides</i> quimiotipo carvacrol, obtenido por MWHD. Columna DB-5 (60 m). <i>Split</i> 1:30. La identificación de los picos aparece en la Tabla 3 .	73
Figura 25	Perfil cromatográfico del AE de <i>L. origanoides</i> quimiotipo felandreno, obtenido por MWHD. Columna DB-5 (60 m). <i>Split</i> 1:30. La identificación de los picos aparece en la Tabla 4 .	76
Figura 26	Perfil cromatográfico de extractos SE de la especie <i>Lippia origanoides</i> : A. Quimiotipo timol; B. Quimiotipo carvacrol y C. Quimiotipo felandreno; obtenidos por HPLC-DAD-UV-Vis en la columna apolar Kinetex C18 (4.6 mm × 100 mm, 2.5 μm); 1- Quercetina, 2- Luteolina, 3- Naringenina, 4- Pinocebrina.	79
Figura 27	Curva de calibración del Trolox [®] por el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS ^{•+} .	84
Figura 28	Esqueleto compartido por los cuatro flavonoides encontrados en los extractos de los tres quimiotipos de <i>L. origanoides</i> .	86
Figura 29	Estructura de los cuatro flavonoides identificados en los extractos con solvente. A Luteolina, B Quercetina, C Naringenina, D Pinocebrina	87
Figura 30	Curva de calibración del Trolox [®] por el método de ORAC.	91
Figura 31	Perfil cromatográfico típico de derivados carbonílicos generados en el aceite de seje, sometido a la radiación UVA.	93
Figura 32	Evaluación del efecto protector de los AE y extractos bajo estudio, contra la peroxidación lipídica del aceite de seje, acelerada por la radiación UVA.	98

LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1	Identificación taxonómica y número de <i>voucher</i> de las especies bajo estudio.	52
Tabla 2	Composición química del AE de <i>L. origanoides</i> , quimiotipo timol, obtenido por MWHD.	72
Tabla 3	Composición química del AE de <i>L. origanoides</i> , quimiotipo carvacrol, obtenido por MWHD.	74
Tabla 4	Composición química del AE de <i>L. origanoides</i> , quimiotipo felandreno, obtenido por MWHD.	76
Tabla 5	Capacidad de atrapar radicales medida por el método de decoloración del catión-radical ABTS ⁺	81
Tabla 6	Cantidad relativa (%) de los ácidos grasos presentes en el aceite de seje.	91
Tabla 7	Porcentaje de protección de los AE, extractos, mezclas de aceites, mezclas de extractos, BHT y α -tocoferol en el aceite de seje.	99

ANEXOS

		Pág.
Anexo A	PERFIL CROMATOGRÁFICO DE LOS ÁCIDOS GRASOS PRESENTES EN EL ACEITE DE SEJE.	126
Anexo B	CURVA DE CALIBRACIÓN DEL HEXANAL REALIZADA POR GC-ECD.	127
Anexo C	PERFILES CROMATOGRÁFICOS, OBTENIDOS POR GC-ECD DEL HEXANAL ANALIZADO EN FORMA DE SU DERIVADO HIDRAZÓNICO, GENERADOS EN EL ACEITE DE SEJE SOMETIDO A LA RADIACIÓN UVA.	127

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ABTS	Ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
AE	Aceite esencial o aceites esenciales
AAPH	[2,2'-Azobis(2-amidinopropano) hidrocloreuro]
BHA	<i>Butylated Hydroxyanisole</i> (Butilhidroxianisol)
BHT	<i>Butylated Hydroxytoluene</i> (Butilhidroxitolueno)
°C	Grado (s) Celsius
d_f	Espesor de fase estacionaria
CENIVAM	Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales
eV	Electrón-Voltio
FA	<i>Fatty Acids</i> (Ácidos grasos)
FAME	<i>Fatty Acid Methyl Esters</i> (Ésteres metílicos de ácidos grasos)
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases)
FL	Fluoresceína [sal de disodio de 3',6'-dihidroxi-spiro (3H-isobenzofuran-1,9'-xanten)-3-ona]
GC-ECD	<i>Gas Chromatography/Electron Capture Detector</i> (Cromatografía de gases acoplada a un detector de captura de electrones).
GC-FID	<i>Gas Chromatography/Flame Ionization Detector</i> (Cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización de llama)
GC-MS	<i>Chromatography/Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada a un detector de espectrometría de masas)
et al.	Y otros
e.g.	Por ejemplo

HAT	<i>Assays Based o Hydrogen Atom Transfer</i> (Reacciones de transferencia de un átomo de hidrógeno)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficacia)
m/z	Relación masa/carga
MWHD	<i>Microwave-Assisted Hydrodistillation</i> (Hidrodestilación asistida por la radiación de un microondas)
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> (Capacidad de absorción del oxígeno radical)
PDMS/DVB	<i>Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene.</i> Poli(dimetilsiloxano)/divinilbenceno
PFPH	<i>Pentafluorophenylhydrazine</i> (pentaflúorfenilhidracina)
SPME	<i>Solid-Phase Microextraction</i> (Microextracción en fase sólida)
TEAC	<i>Trolox[®] Equivalent Antioxidant Capacity</i> (Capacidad antioxidante total equivalente al Trolox [®])

RESUMEN

TÍTULO: EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS DE TRES QUIMIOTIPOS DE *Lippia origanoides*, POR LOS MÉTODOS TEAC Y ORAC, Y SU EFECTO PROTECTOR EN UNA MATRIZ PORTADORA DE VITAMINA F (ACEITE DE SEJE)*.

AUTOR: Alejandra González Hurtado**; Laura Guarguati Guarguati**

PALABRAS CLAVES: *Lippia origanoides*, hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD), extracción por solvente, peroxidación lipídica, capacidad de absorción de radicales oxígeno, ensayo de decoloración del catión-radical ABTS⁺.

La presente investigación consistió en determinar la capacidad antirradicalaria de los aceites esenciales (AE) y extractos de tres quimiotipos de la especie *Lippia Origanoides*, cultivada y recolectada en la zona de siembra del CENIVAM, ubicado en el campus principal de la Universidad Industrial de Santander (UIS), Bucaramanga, mediante los métodos ORAC y TEAC en un lector de microplacas *Turner Biosystems Inc., Modulus™ II Microplate Multimode Reader*, con microplacas de poli(estireno) de 96 pozos y equipado con módulos de absorbancia UV-Vis y fluorescencia (*Sunnyvale, CA, EE.UU.*); y mediante el monitoreo del hexanal como producto del deterioro oxidativo del ácido linoléico presente en el aceite de seje, para lo cual, se empleó la microextracción en fase sólida en modo *head-space* (HS-SPME), y la cromatografía de gases con detector de micro-captura de electrones (GC- μ -ECD) para la medición del derivado hidrazónico obtenido por derivación del hexanal con pentafluórfenilhidracina (PFPH).

Los resultados obtenidos en el ensayo ORAC mostraron que los AE y los extractos presentaron mayor capacidad de atrapar radicales peroxilo frente a los antioxidantes comerciales, BHT y α -tocoferol. Mientras que en el ensayo TEAC, solo los AE de los quimiotipos timol y carvacrol, fueron los únicos que presentaron mayor capacidad de atrapar el catión-radical ABTS⁺ frente a los antioxidantes comerciales. Por otro lado, el grado de protección del extracto del quimiotipo felandreno ($73 \pm 2\%$) y la mezcla de los aceites esenciales, quimiotipo carvacrol y timol, en proporción (1:1) ($72 \pm 2\%$), en la peroxidación lipídica del aceite de seje, mostraron mayor capacidad antirradicalaria con respecto a las sustancias control BHT ($66 \pm 3\%$) y α -tocoferol ($60 \pm 3\%$).

* Trabajo de grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directora, Elena E. Stashenko; Co-director: Jairo René Martínez

ABSTRACT

TITLE: EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT CAPACITY OF THE ESSENTIAL OILS AND EXTRACTS OF THREE CHEMOTYPES OF *Lippia organoides* by TEAC AND ORAC METHODS, AND ITS PROTECTIVE EFFECT IN A CARRIER MATRIX OF VITAMIN F (SEJE OIL)*.

AUTHOR: Alejandra González Hurtado**; Laura Guarguati Guarguati**

KEYWORDS: *Lippia organoides*, microwave assisted hydrodistillation (MWHD), extraction by solvent, lipid peroxidation, absorption capacity of oxygen radicals, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.

The present investigation consisted in determine the antiradical capacity of the essential oils (AE) and extracts from three chemotypes of *Lippia organoides* species, cultivated and harvested in the area of planting CENIVAM, located on the main campus of the Universidad Industrial de Santander (UIS), Bucaramanga by ORAC and TEAC methods in a microplate reader Turner Biosystems Inc., Modulus™ II Microplate Multimode Reader microplate poly (styrene) of 96 wells and equipped with modules of absorbance UV-Vis and fluorescence (Sunnyvale, CA, USA) and by monitoring the hexanal as product of oxidative degradation of linoleic acid present in seje oil, for which was used the solid phase microextraction head-space mode (HS-SPME), and gas chromatography with detector of micro-capture's electron (μ -GC-ECD) for measuring the derivative obtained by derivatization hydrazonic with pentafluórfenilhidracina hexanal (PFPH).

The ORAC test results showed that the AE and the extracts showed greater capacity trapping peroxy radicals compared with commercial antioxidants, BHT and α -tocopherol. While in the TEAC assay, only the AE of thymol and carvacrol chemotypes were the only ones that showed the greatest ability to trap radical cation ABTS⁺ compared with commercial antioxidants. Furthermore, the degree of abstract protection of phellandrene chemotype ($73 \pm 2\%$) and the mixture of essential oils, carvacrol and thymol chemotype, in proportion (1:1) ($72 \pm 2\%$), in the seje oil's lipid peroxidation showed higher antiradical capacity with respect to control substances BHT ($66 \pm 3\%$) and α -tocopherol ($60 \pm 3\%$).

* Colleague thesis

** Sciences Faculty, School of Chemistry. Director, Elena E. Stashenko; Co-director, Jairo René Martínez.

INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales (AE) y extractos de plantas aromáticas han exhibido actividad biológica, tales como antifúngica, antiviral, insecticida, antioxidante, entre otras [1]. Por ello, plantas con estas características se convierten en una fuente alternativa con propiedades biológicas capaces de sustituir componentes artificiales. Colombia puede representar para los empresarios del sector de Cosméticos y Productos de Aseo, entre otros, una gran oportunidad como lugar para el establecimiento de sus empresas, ya que es un país que posee una ventaja comparativa grande, por su inmensa riqueza en recursos naturales [2]. Colombia, actualmente, es considerado el segundo país, después de Brasil, con mayor diversidad florística, donde se reportan 50.000 especies de flora, en la que 6.000 cuentan con características medicinales y 18.000 son especies endémicas [2]. Por lo cual, la diversidad química y biológica que poseen las plantas se convierte en el principal objeto de estudio de muchos grupos de investigación.

El desarrollo industrial creciente para satisfacer las necesidades de la sociedad, ha impulsado la búsqueda de sustancias de origen natural o sintético que puedan presentar algún tipo de actividad biológica. Ejemplo de esto es el interés por encontrar nuevos compuestos o mezclas antioxidantes, que sean ampliamente utilizados como conservantes en cosméticos, alimentos, polímeros, combustibles, lubricantes, productos de aseo personal, entre otros. En el caso particular del sector cosmético, el uso de productos cosméticos y de aseo personal, que contienen antioxidantes sintéticos, puede causar en el consumidor lesiones en la piel, relacionadas con diferentes formas de dermatitis, alergias, infecciones bacterianas, problemas de pigmentación e incluso un cáncer [1]. En consecuencia, el sector cosmético busca aumentar los beneficios de sus productos, innovando en el mercado con productos naturales, especialmente, en los de origen vegetal. De

ahí, que sea de particular importancia el desarrollo de métodos para la evaluación de las propiedades antioxidantes de las plantas.

La capacidad antioxidante se utiliza ampliamente como parámetro para caracterizar diferentes materiales vegetales. Esta capacidad se relaciona con compuestos capaces de proteger un sistema biológico del efecto, potencialmente dañino, de aquellos procesos que causan excesiva oxidación e involucran especies reactivas de oxígeno. Existen diversos métodos para la evaluación de la capacidad antioxidantes de muestras biológicas. Algunos de ellos utilizan la producción de un radical orgánico o especies reactivas del oxígeno, y otros se basan en la oxidación-reducción de iones metálicos.

En el presente trabajo, se evaluaron *in vitro* las propiedades antioxidantes de aceites esenciales y extractos obtenidos de tres quimiotipos de la especie *Lippia origanoides*; Familia Verbenácea. Se utilizaron métodos colorimétricos de *screening* (ensayos con el catión-radical ABTS⁺) y de fluorescencia (ORAC), implementados en un lector de microplacas. Además, se evaluó el grado de protección de los AE y extractos contra el deterioro oxidativo, mediante el seguimiento y monitoreo del hexanal, compuesto generado durante la oxidación del aceite de seje por la degradación oxidativa del ácido linoléico; el aceite fue sometido a un proceso de oxidación “acelerada” inducida por radiación UVA. Con el fin de cuantificar el producto de la oxidación se realizó la derivación con pentaflúorfenilhidrazina (PFPH), usando microextracción en fase sólida (SP μ E) y cromatografía de gases con detector selectivo de μ -captura de electrones.

1 ESTADO DEL ARTE

1.1 *Lippia origanoides*

Lippia origanoides pertenece al género *Lippia* de la familia Verbenaceae. También se le conoce como “orégano mexicano”, “orégano de monte” (Costa Rica, Guatemala, Honduras y México) y “orégano de menudo” (Nicaragua) [3]. La familia Verbenaceae se caracteriza por presentar especies con diversidad de quimiotipos, para lo cual, la composición química de los AE determina sus diferentes aplicaciones [4].

Lippia origanoides es un arbusto delgado perenne, que crece de 1 a 2 m de altura, presenta numerosas ramas, hojas aromáticas, ovadas, pilosas, con un margen finamente delgado y textura rugosa, que presentan de 2 a 4 cm de largo [3]. Sus flores dentadas son de color blanco y densamente pilosas [5]. (Figura 1).

Figura 1. *Lippia origanoides* cultivada en CENIVAM-UIS, Bucaramanga.



Fotos tomadas por Alejandra González. Lugar: CENIVAM, UIS. Fecha: Agosto de 2012.

Se ha reportado la existencia en diferentes partes de la planta de glicósidos saponinícos, taninos, triterpenos y, en el AE, se ha encontrado compuestos como borneol, canfeno, carvacrol, *trans*- β -cariofileno, 1,8-cineol, *p*-cimeno, eugenol, humuleno, lapachol, mirceno, naringenina, α -pineno, β -pineno, pinocembrina, terpinen-4-ol, α -terpineno, α -terpineol, α -tujeno y timol [3,5].

La planta es originaria de América; se distribuye desde el sur de Texas hasta el norte de Costa Rica, en Colombia, Venezuela y el sur de Brasil [3,6].

Lippia origanoides se utiliza como hierba para culinaria o como medicina para afecciones respiratorias y digestivas. Se le atribuyen propiedades antioxidante, antiséptica, aromática, carminativa, cicatrizante, desinflamante, digestiva, emenagoga, espasmolítica, estimulante, estomáquica, expectorante, sudorífica y tónica [3].

Estudios han demostrado que el AE de *Lippia origanoides* es un antioxidante, que no presenta citotoxicidad en células Vero, inhibe el desarrollo de hongos de los géneros *Asperillas* y *Candida*, promatigotes de *Leishmania chagasi* y algunas bacterias incluyendo *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Salmonella tiphymurium* ATCC 13313 [7,8].

1.2 ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS

Los aceites esenciales son el resultado del metabolismo secundario de las plantas. Son mezclas de varias sustancias químicas, que se encuentran almacenadas en las células vegetales, y que dan la fragancia característica de algunas flores, árboles, semillas, etc. Se les llama “aceites esenciales” porque

presentan compuestos volátiles, que por su estructura molecular, generan estímulos en el sistema olfativo del ser humano [9].

La actividad biológica, que presentan los AE, entre ellas, antimicrobiana, antioxidante, fungicida, analgésica, sedativa, antiinflamatoria, espasmolítica, se derivan de los mecanismos de defensa desarrollados por la planta contra los insectos, animales herbívoros, que disminuye, en algunos casos, el apetito de estos por la planta. Dichas propiedades se aprovechan en las industrias cosmética, licorera, tabacalera, alimenticia, farmacéutica, entre otras [10,11].

Los extractos constituyen la fracción no volátil de los principios activos y, por ser no volatilizables o ser inestables con la temperatura, no se pueden extraer mediante destilación como ocurre con los AE, sino que se extraen mediante diversas técnicas utilizando solventes, como agua, etanol o éter, que penetran el material vegetal seco o fresco y disuelven las sustancias; luego el solvente se evapora y se concentra a baja temperatura, para obtener la fracción que se va a utilizar [12].

1.3 COMPUESTOS FENÓLICOS

Generalidades. Los compuestos fenólicos son estructuras químicas formadas por uno o más anillos aromáticos unidos a uno o más grupos hidroxilo, incluyendo, también, derivados funcionales como ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc. Estos abarcan un grupo amplio y diverso de compuestos, que presentan funciones, como contribuir al crecimiento y desarrollo de la planta, hasta crear su propio mecanismo de defensa contra agentes agresores externos, la radiación UV, los

microorganismos, insectos y otros animales herbívoros, y al entorno (medio ambiente) [11].

De acuerdo con la diversidad química, los compuestos fenólicos tienen diversas funciones en las plantas, y su presencia depende de la especie vegetal, así como también, de la parte de la planta considerada (frutos, semillas, hojas, tallos, etc.) y las condiciones agroclimáticas de su cultivo. Estos compuestos se clasifican en grupos, según el número de carbonos que conforman la molécula, por ejemplo: ácidos fenólicos, cumarinas, naftoquinonas, xantonas, estilbenos y flavonoides. De modo general, su clasificación se basa en la distinción entre compuestos flavonoides y no flavonoides. En estos últimos, se encuentran los ácidos fenólicos y estilbenos; entre los ácidos fenólicos, se destacan los ácidos hidroxibencénicos y hidroxicinámicos, derivados del ácido benzoico y cinámico, respectivamente [11].

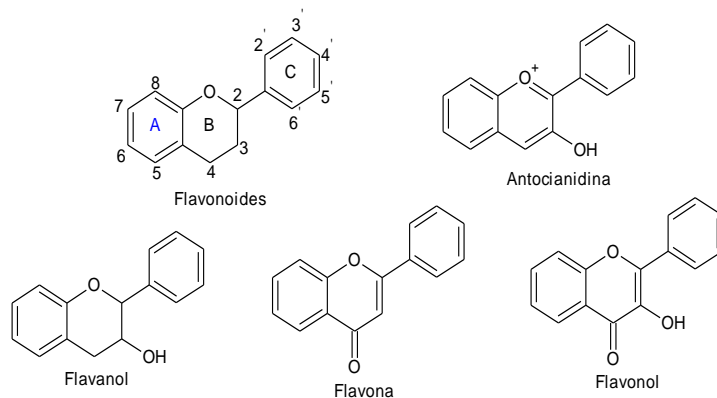
1.3.1 Flavonoides. Los flavonoides son polifenoles que se caracterizan por poseer dos anillos aromáticos bencénicos unidos por un puente de tres átomos de carbono, es decir, presentan un esqueleto carbonado $C_6-C_3-C_6$. Estos compuestos por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano. Dentro del grupo de esta gran familia, los más destacados, por su interés farmacológico, son las flavonas, flavonoles, flavanonas, antocianidinas, catequinas y sus correspondientes glucósidos (Véase **Figura 2**) [11].

Los flavonoides se encuentran hidroxilados en las posiciones 3, 5, 7, 3', 4', 5'. La presencia o ausencia de un grupo hidroxilo unido a la posición 3 determina el tipo de flavonoide.

Los flavonoides, en particular, exhiben una amplia gama de efectos biológicos, incluyendo actividades antibacteriana, antiviral, antiinflamatoria, antialérgica,

antitumoral, antifúngica, como también, capacidad antioxidante de vitaminas y ácidos grasos insaturados, mediante su actividad atrapadora de radicales libres [13].

Figura 2. Estructura básica y ejemplos de flavonoides



La acción antioxidante de los compuestos fenólicos resulta de sus propiedades quelantes para formar complejos con metales di- o trivalentes y de la capacidad secuestradora de radicales libres [13]. Sus características antioxidantes, se deben a que estabilizan las especies reactivas de oxígeno (ERO), tales como el anión superóxido y el radical hidroxilo; esto se debe a la presencia de grupos hidroxilo unidos a un anillo bencénico, que facilitan, además, la deslocalización electrónica, porque disminuyen la energía y la reactividad del nuevo radical formado [11].

Este grupo de compuestos químicos presenta un gran interés desde el punto de vista tecnológico y nutricional, por su contribución al mantenimiento de la salud humana; este tema se estudia intensamente mediante ensayos *in vivo* e *in vitro* [13]. Además, se destaca su papel protector preventivo en el desarrollo del cáncer, enfermedades cardiovasculares y en procesos de envejecimiento; así mismo, en

la industria cosmética se aprecian por su capacidad de disminuir la hiperpigmentación de la piel, que se produce durante el embarazo y durante la vejez, y por presentar una actividad desodorante [13, 15].

1.4 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

Existe una gran variedad de métodos empleados para la obtención de los metabolitos secundarios de las plantas, entre los cuales se encuentran la hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHD), extracción con fluido supercrítico (SFE), destilación-extracción simultánea (SDE), extracción sólido-líquido con metanol, etanol, acetona u otros disolventes. [15, 16].

1.4.1 Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD). Esta técnica se basa en el mismo principio de métodos de extracción como la hidrodestilación por arrastre con vapor o hidrodestilación simple [17].

La técnica consiste en la transformación de la energía de las microondas en energía calórica, que entra en contacto con el material vegetal sumergido al agua. Bajo el efecto de la radiación, el agua se calienta hasta ebullición, disolviendo parcialmente el AE alojado en los tejidos vegetales. Las estructuras celulares, que contienen a las esencias se rompen por efecto de su presión de vapor; el aceite se libera, y se dirige, junto con el vapor de agua, al recipiente tipo *Clevenger* donde se colecta, se condensa y se separa por decantación [17, 18].

La técnica es eficaz para la extracción de los aceites esenciales a escala de laboratorio, debido a la sencillez del montaje, la rapidez para la obtención del aceite y su relativa economía. La ventaja de usar la energía de microondas, y no

una fuente de calor en contacto directo, permite un calentamiento más efectivo y una rápida transferencia de energía [19].

1.4.2 Extracción con disolvente. Esta técnica emplea una fase líquida, para aislar los analitos de la matriz. Comúnmente en la extracción de compuestos fenólicos se utilizan disolventes polares diluidos en diferentes proporciones con agua, a saber: metanol, etanol y acetona [20].

En la SE (SE, *Solvent Extraction*, por sus siglas en inglés) los compuestos de interés se aíslan de la muestra, mientras el disolvente puede removerse del extracto sin afectar la composición de la muestra. La eficiencia de la extracción depende principalmente de tres factores, a saber: (1) solubilidad, (2) transferencia de masa y (3) efecto de matriz [18]. Aunque la extracción con disolvente se utiliza ampliamente, la técnica presenta desventajas, entre ellas, el consumo de disolventes es alto y el tiempo de extracción es prolongado, se generan residuos no deseados y puede suceder la co-extracción de interferencias [21].

1.5 SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

1.5.1 Cromatografía de gases. Es una técnica analítica, utilizada para separar los componentes de una muestra y, al mismo tiempo, determinar sus concentraciones. Las separaciones cromatográficas utilizan repartos selectivos de los componentes de la muestra entre una fase estacionaria, que permanece inmovilizada en el interior de una columna, y una fase móvil, que la atraviesa. Una columna GC capilar consta de dos partes principales: tubo y fase estacionaria. Una película fina (de 0,1 a 10,0 μm) de un polímero térmicamente estable, con un

elevado peso molecular, recubre la pared interna del tubo de diámetro pequeño (entre 0,05 y 0,53 mm) [22,23].

La columna se encuentra dentro del horno, donde la temperatura se ajusta según los requerimientos de análisis. La temperatura óptima de la columna depende del punto de ebullición de los analitos en la muestra y del grado de separación requerido. Los analitos, que eluyen de la columna, pasan a un detector, que registra las diferentes sustancias y genera una señal proporcional a su cantidad [24,25].

1.5.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. La combinación de la cromatografía de gases con espectrometría de masas (GC-MS, por sus siglas en inglés, *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) es una de las herramientas analíticas más poderosas. En los últimos años, se ha demostrado que es uno de los métodos más eficientes y utilizados para el estudio de la composición de los AE de diversas plantas [26,27].

Los componentes del AE pueden ser simultáneamente separados e identificados con base en los tiempos de retención, índices de retención lineal (LRI) y los patrones de fragmentación, únicos para cada sustancia [29].

Los tiempos de retención de la sustancia y de los de hidrocarburos lineales se utilizan para determinar los llamados índices de retención lineales (Véase **Numeral 3.4.1**), que sirven para identificar tentativamente los compuestos, pues todas las sustancias, que se analizan por GC, tienen LRI diferentes. Una identificación tentativa por espectrometría de masas se hace por comparación del espectro de masas de la sustancia con los espectros de distintas bases de datos,

e.g., *Adams, NIST, Wiley*. La identificación confirmatoria se hace con los patrones certificados.

1.5.3 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Es la técnica más usada para el análisis de compuestos fenólicos en diferentes matrices. En general, para el análisis de flavonoides se ha empleado principalmente la cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC), es decir, cuando la fase estacionaria posee menor polaridad que la fase móvil [29].

Los gradientes de elución se realizan con sistemas binarios de disolventes, tales como: soluciones acuosas acidificadas con ácidos acético, trifluoroacético, perclórico, *o*-fosfórico o fórmico, o con *buffer*, acetato o formiato en agua (solvente A) y con metanol, acetonitrilo como modificadores orgánicos (solvente B) [29, 30].

En cuanto a los sistemas de detección, tres, de los más empleados, son UV-Vis, detector con arreglo de diodos (DAD) y MS. Todos los compuestos fenólicos contienen, por lo menos, un anillo aromático; en consecuencia, absorben luz ultravioleta [26]. Para el caso de los flavonoides, el primer máximo se encuentra entre 240-285 nm, debido al anillo A y, el segundo máximo, se presenta en el rango de 300-550 nm, debido al anillo C [29].

1.6 PRODUCTOS COSMÉTICOS

1.6.1 Definición de productos cosméticos. *Cosmetic Toiletry Fragrance Association* (CTFA) define “cosméticos” como artículos que, ungidos, frotados, introducidos o aplicados en el cuerpo humano, tienen como finalidad la limpieza, el embellecimiento, el promover atractivo o alterar apariencia, no se incluyen los jabones [31].

1.6.2 Cosmecéuticos. El creciente interés de los consumidores por aquellos productos que poseen ingredientes naturales ha abierto la puerta para los denominados “*cosmecéuticos*”, término que se empleó por primera vez en 1946, pero sólo hasta 1981 este concepto tomó fuerza cuando Albert M. Kligman, lo usó para describir un grupo de productos con características cosméticas y medicinales. Sin embargo, para la *Food and Drug Administration* (FDA) es un medicamento. Para la industria de cosmética, los *cosmecéuticos* se describen como productos que se sitúan en el límite de cosméticos y productos farmacéuticos. Esta definición ha sido adoptada por la compañía de investigación de mercado Euromonitor, la cual define *cosmecéuticos* como la “difuminación” de la cosmética y la farmacéutica; que contienen ingredientes biológicamente activos y que tienen un efecto en el usuario [32].

De acuerdo con los estudios de mercado de CBI [33], la rápida evolución de la comercialización de los *cosmecéuticos* está relacionada con el uso de nuevos ingredientes bioactivos, que mejoran la fisiología interna de la piel. Su importancia comercial se puede medir por el tipo de aplicación de un producto o por la constitución química, donde los ingredientes activos están presentes en su composición [33].

Los principales mercados de AE en productos cosméticos son para el cuidado de la piel y el cabello, fragancias/perfumes y en aromaterapia. De esta manera, se pueden considerar como materias primas, también, para elaborar productos *cosmecéuticos*, con el fin de aprovechar su bioactividad para el cuidado de la piel; entre otras, la acción antioxidante, encargada de disminuir o prevenir el ataque de los radicales libres; la acción antimicrobiana, utilizada para controlar infecciones de tipo bacteriano y micótico, y la acción antiinflamatoria, para lesiones ocasionadas por dermatitis [33].

1.6.3 Causas del deterioro en los cosméticos. Los microorganismos, contaminantes potenciales de los cosméticos, son las bacterias, como el *Bacillus sp*, *Pseudomona sp*, especialmente, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp*, *Propioni bacterium acnés*, *Granulosomy avidem*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, y los hongos, entre ellos se encuentran los mohos y las levaduras, *Penicillium* y *Aspergillus sp*, *Candida albicans* y *Trichophyton mentagrophytes*. Estos pueden provocar la aparición de toxinas, productos catabólicos, que reaccionan con ácidos grasos y orgánicos, y pueden producir reacciones alérgicas o irritación primaria. Al mismo tiempo, degradan los aceites y separan las fases de una emulsión, ocasionan cambios de color, cambios en las propiedades organolépticas, aparición de manchas en la superficie y rancidez en el producto [31].

La oxidación de los lípidos es otra causa del deterioro de los cosméticos. Es una reacción en cadena, es decir, que una vez iniciada, continúa acelerándose hasta la oxidación total de las grasas [31,35].

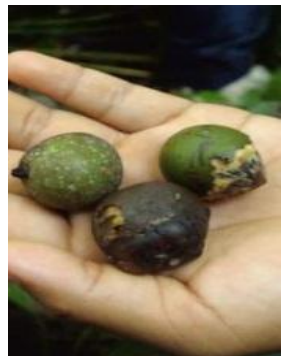
1.7 ACEITE DE SEJE

El aceite de seje proviene de los frutos de la palmera seje, que puede alcanzar los 25 m de altura. Esta palmera pertenece a la especie *Oenocarpus bataua* de la familia *Arecaceae*. La planta presenta frutos de color violeta, un mesocarpio oleaginoso, semillas cubiertas por fibras delgadas y hojas dispuestas en forma de cola de caballo. En Colombia, se le conoce como la palma de milpesos y Aricaguá; crece silvestre en las selvas del Chocó, el Amazonas y los Llanos Orientales [35, 36]. El aceite de seje contiene ácidos grasos, entre ellos, ácido linoléico, linolénico, esteárico y araquídico [36].

Gracias a su composición química, rica en ácidos grasos insaturados, el aceite de seje ha presentado aplicaciones tanto medicinales, como cosméticas y alimenticias. Se han utilizado para prevenir enfermedades respiratorias, como asma, bronquitis y tos; también como laxante y estimulante en los movimientos intestinales [36]. Se ha usado como tónico para el cabello; para la fabricación de jabones y velas, gracias al alto índice de saponificación, y para la elaboración de cosméticos naturales como emoliente e hidratante [35, 36].

El aceite de seje es uno de los aceites vegetales que provee dos ácidos grasos esenciales. Se llaman así, porque el organismo no los puede sintetizar y deben ingerirse en la dieta. El ácido linoleico y el ácido linolénico, forman parte de la vitamina F. Dicha vitamina, funciona como barrera en la epidermis para evitar la eliminación del agua, y además, permite combatir la excoriación de la piel por dermatitis escamosa, piel seca, desigual y agrietada; ayuda a mantener una piel joven y un cabello saludable [37].

Figura 3. Especie *Oenocarpus bataua* (Familia Arecaceae).



Fotos tomadas de Expediciones botánicas siglo XXI [33].

1.8 ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes son un grupo amplio de compuestos: vitaminas, compuestos fenólicos, minerales, colorantes naturales y enzimas, que, en bajas concentraciones, previenen o inhiben la oxidación de las grasas, vitaminas, proteínas y otras biomoléculas, fácilmente oxidables. Estas oxidaciones pueden causar colores, olores y sabores desagradables en alimentos, productos cosméticos y farmacológicos, entre otros. Los productos de la oxidación pueden producir efectos nocivos en la salud [38].

Los antioxidantes pueden inhibir o retardar los procesos de oxidación. Según los mecanismos de acción, se clasifican de la siguiente manera:

Antioxidantes preventivos: Son compuestos inhibidores de las reacciones que implican la formación de radicales libres (Etapa de iniciación), al secuestrar o formar complejos con sustancias iniciadoras como oxígeno singulete, oxígeno triplete o iones metálicos [39].

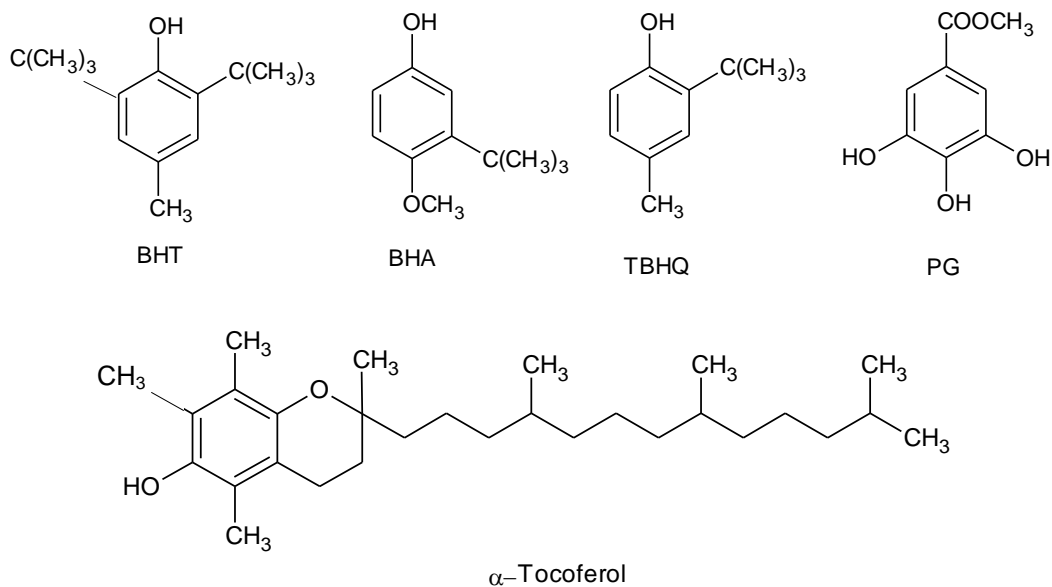
Antioxidantes de ruptura de cadena: Actúan sobre los radicales generados durante la peroxidación lipídica ($R\cdot$, $RO\cdot$, $RO_2\cdot$). Son compuestos donadores de hidrógeno o electrón e interrumpen una reacción en cadena. La vitamina E, los galatos y los flavonoides son compuestos estables, que tienen la capacidad de formar dímeros o reordenar su estructura, para permitir la reacción con un radical alcoxilo o peroxilo, detienen así la reacción de oxidación del sustrato [39].

Los antioxidantes, también, pueden clasificarse según su origen, como naturales o sintéticos. La mayoría de los antioxidantes naturales, que son extraídos de plantas o tejidos animales, son compuestos fenólicos, por ejemplo, tocoferoles,

flavonoides, ácidos fenólicos y gálicos y, en algunos casos, carotenoides y terpenoides, que también han demostrado actividad antioxidante [40, 41]. Entre los antioxidantes sintéticos, se encuentran también los de tipo fenólico; sus capacidades antioxidantes están relacionadas con sus estructuras químicas [42].

Entre los antioxidantes disponibles comercialmente de uso más frecuente, figuran los siguientes: el butil-hidroxianisol (BHA), el butil-hidroxitolueno (BHT), la *ter*-butilhidroquinona (TBHQ) y el galato de propilo (PG) [42]. Estudios sobre antioxidantes sintéticos [43] han demostrado, que muchos de estos ejercen efectos tóxicos sobre los tejidos de animales, y pueden ser cancerígenos en altas concentraciones, por lo que su uso en productos de consumo humano es bastante cuestionable [44]. No obstante, algunos de estos antioxidantes pueden poseer propiedades favorables, e.g., antimutagénicas y antitumorales [45].

Figura 4. Estructuras químicas de algunos antioxidantes sintéticos usados en alimentos y cosméticos. BHA: Butil-hidroxianisol; BHT: Butil-hidroxitolueno; TBHQ: *ter*-butilhidroquinona; PG: Galato de propilo; α -tocoferol.



1.9 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.

Debido a la complejidad de los extractos de plantas y alimentos, el aislamiento de cada antioxidante, para su estudio individual, resulta un proceso muy costoso y, a menudo, ineficiente; se han desarrollado varios métodos para cuantificar la acción de los antioxidantes presentes en extractos (mezclas complejas). Sin embargo, no existe un método estándar, único, para esta determinación [46].

La estandarización de estos métodos es necesaria para determinar la capacidad antioxidante, realizar comparaciones significativas de alimentos o productos comerciales, tener un control de las variables en las mediciones y cumplir con los estándares de calidad en los resultados obtenidos [47]. Este es el caso de los extractos de plantas, para los cuales es necesario desarrollar varias metodologías porque la capacidad antioxidante no sólo depende de su composición química, sino también de las condiciones de medición empleadas [48,49].

Los métodos, que permiten evaluar la capacidad antioxidante de diversos tipos de sustancias que los contienen, se pueden clasificar en dos grandes grupos: (1) aquellos que determinan la capacidad de inhibir la oxidación lipídica, y (2) los que miden la habilidad para secuestrar radicales [50].

En el primer grupo, se usa el sistema modelo *in vitro* para el proceso de peroxidación lipídica, el cual se somete a una rápida oxidación, que puede ser inducida por radiación UV o metales de transición, que participen en reacciones de transferencia de electrones, entre otros [50].

Por otro lado, los métodos que determinan la capacidad atrapadora de radicales, imitan los mecanismos, que suceden en la oxidación de lípidos, y miden la

reducción de radicales inestables por transferencia de un electrón o transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT). El resultado final de estos dos procesos es el mismo, pero la cinética y las reacciones secundarias son diferentes [50].

Las reacciones de transferencia de electrones y las reacciones HAT pueden ocurrir en paralelo. El mecanismo dominante será determinado por la estructura y las propiedades del antioxidante individual o en mezcla, su solubilidad, el coeficiente de partición y el disolvente del sistema. La energía de disociación de enlace (BDE) y el potencial de ionización (IP) son dos factores, que explican o condicionan el mecanismo y la eficiencia de los antioxidantes [50].

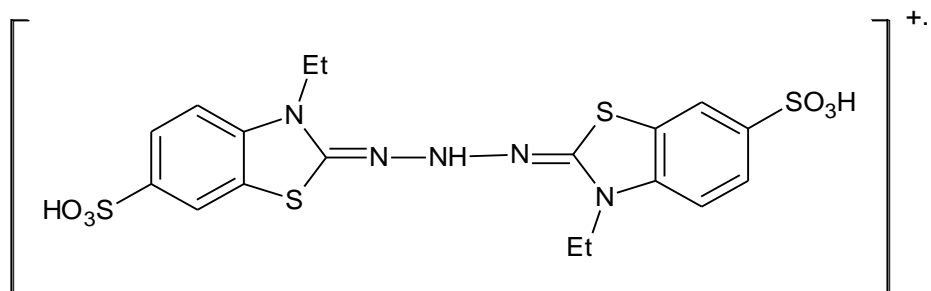
Los antioxidantes individuales pueden, en algunos casos, actuar por los dos mecanismos o por uno solo, dependiendo del sistema de reacción. Además, la respuesta de estos es diferente a la de las distintas fuentes radicalarias u oxidantes [49].

1.9.1 Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS^{•+} o TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*). Es un método espectroscópico que consiste en la medición de la disminución de la coloración de un radical preformado ABTS^{•+} (Véase **Figura 5**), que presenta una coloración azul-verde con máximos de absorción en longitudes de onda de 415, 645, 734 y 815 nm [51].

Al exponer el ABTS^{•+} al antioxidante, este último lo reduce, al donarle un electrón, para estabilizarlo; en consecuencia, hay una disminución en la coloración y en la absorbancia, debido a que el ABTS^{•+} pasa a ABTS, sustancia incolora. El grado de decoloración puede ser medido a diferentes longitudes de onda, y el porcentaje de inhibición se evalúa como la capacidad de reducción del antioxidante. Este porcentaje determina la capacidad antioxidante en comparación con la reactividad

relativa del Trolox[®] [47]. La cuantificación se basa en la curva de calibración con Trolox[®], un análogo sintético hidrosoluble de la vitamina E.

Figura 5. Estructura química del catión-radical ABTS⁺.



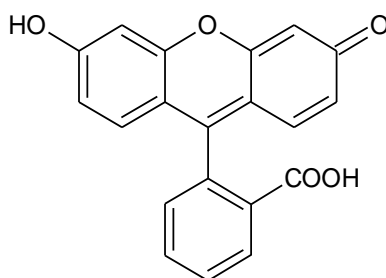
1.9.2 Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC). Es uno de los métodos HAT. El mecanismo de reacción se basa en la transferencia al radical libre de un átomo de hidrógeno del antioxidante. Para ello, se emplea un indicador, para generar el radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$). En presencia de un compuesto antioxidante (AH), el radical forma un enlace con un átomo de hidrógeno del AH y se origina un hidroperóxido (ROOH) y un radical antioxidante estable (A) [52].

Este ensayo es un ejemplo del rompimiento de reacciones en cadena, por transferencia de un átomo de hidrógeno proveniente de un compuesto antioxidante. Los radicales peroxilo reaccionan con el indicador, un compuesto fluorescente, fluorescina (FL) (Véase **Figura 6**), que se oxida para neutralizar los radicales, formando un producto sin fluorescencia. La velocidad en la disminución de la fluorescencia puede reducirse en presencia de un antioxidante, ya que este compite con el compuesto fluorescente para estabilizar el radical. La capacidad antioxidante se determina por la disminución en la fluorescencia y la cantidad de producto formado en función del tiempo [49]. Esta metodología puede ser

adaptada para la detección de antioxidantes tanto hidrofílicos como hidrofóbicos [53].

La protección del antioxidante se mide a partir del área bajo la curva (ABC) de la muestra y del blanco de reacción. La diferencia de estos valores se extrapola en la curva de calibración del Trolox® [52].

Figura 6. Estructura química de la fluorescina.



1.9.3 Peroxidación lipídica. La peroxidación de lípidos es un proceso de degradación oxidativa de los ácidos grasos poliinsaturados expuestos a la presencia de iones metálicos, calor, la radiación y a especies reactivas de oxígeno, tales como ion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el oxígeno singlete (1O_2), el radical hidroxilo (OH^{\cdot}), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) [54-56]. La mayoría de los sistemas orgánicos e inorgánicos presenta esta oxidación, que conduce a los de cambio de color, sabor y olor [55].

Este proceso consiste en una reacción en cadena, que se lleva a cabo por varias etapas, a saber: iniciación, propagación y terminación.

Durante la etapa de iniciación, se forma un radical alquílico por medio de la abstracción de un átomo de hidrógeno de un ácido graso (Véase **Figura 7**).

Los radicales de los ácidos grasos formados ($R\cdot$), tienden a ser estabilizados, mediante rearrreglos intermoleculares conducentes a formar dienos conjugados (Véase **Figura 8**), estos radicales dieno-conjugado pueden reaccionar con el O_2 , originando radicales peróxido $ROO\cdot$. Una vez formados los radicales peróxidos $ROO\cdot$, pueden abstraer un $H\cdot$ del ácido graso insaturado para formar hidroperóxidos $LOOH$ y un nuevo radical del ácido $R\cdot$, que también reaccionará con O_2 , para dar origen a un nuevo radical peróxido $ROO\cdot$, y continuar así la reacción en cadena (Véase **Figura 9**) [57, 58].

Los compuestos formados son los hidroperóxidos, susceptibles a la presencia de metales, que generan reacciones de descomposición e isomerización, en las cuales se forman productos secundarios como hidrocarburos y compuestos carbonílicos [57, 58].

Los hidroperóxidos ($LOOH$), en presencia de iones o complejos de metales de transición como Fe^{2+} y Cu^{2+} , originan los radicales alcoxilo ($RO\cdot$) (Véase **Figura 10**), que pueden abstraer $H\cdot$ de otras moléculas, para formar derivados hidroxilados (a), perder $H\cdot$ y formar las respectivas cetonas (b) o sufrir una escisión β (β -esc), y así formar un aldehído (c); y un radical alquilo (d), que puede dar origen a un hidrocarburo por abstracción de un $H\cdot$ de otra molécula (Véase **Figura 11**) [57,58].

Figura 7. Formación de radicales de ácidos grasos ($R\cdot$) por abstracción de un hidrógeno $H\cdot$, iniciadas por ERO o cualquier RL.

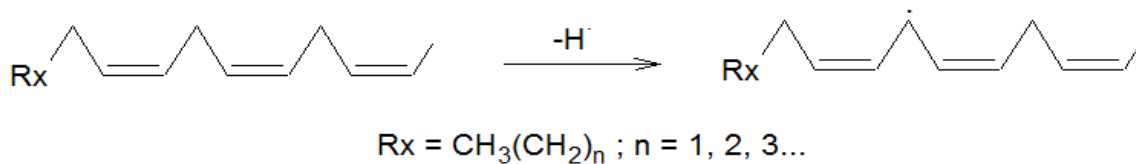


Figura 8. Estabilización de los radicales de ácidos grasos ($R\cdot$) por medio de rearrreglos intramoleculares y formación de peróxidos por reacción de estos radicales con oxígeno.

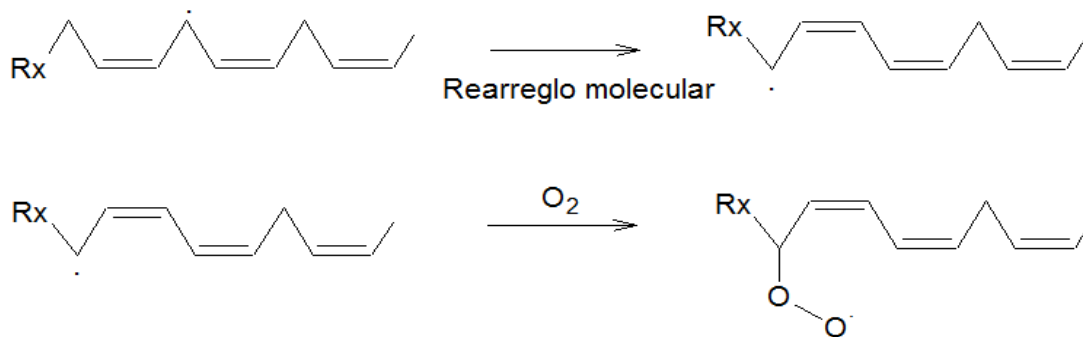


Figura 9. Ataque de un radical peróxido ($ROO\cdot$) a una molécula vecina, abstracción de $H\cdot$ y propagación de la reacción en cadena.

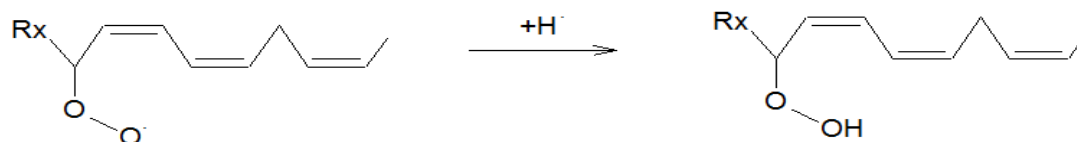


Figura 10. Formación de radicales alcoxilo (RO \cdot) en presencia de metales divalentes, durante la finalización de peroxidación lipídica.

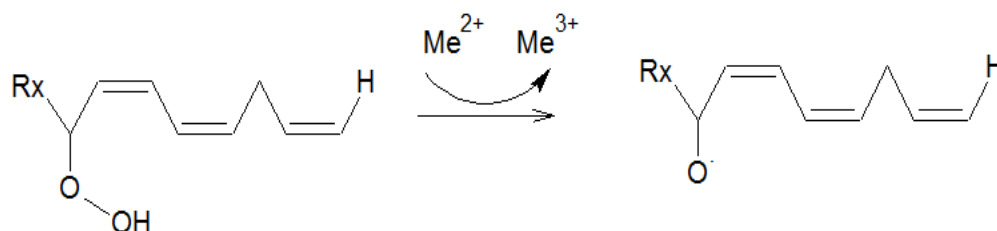
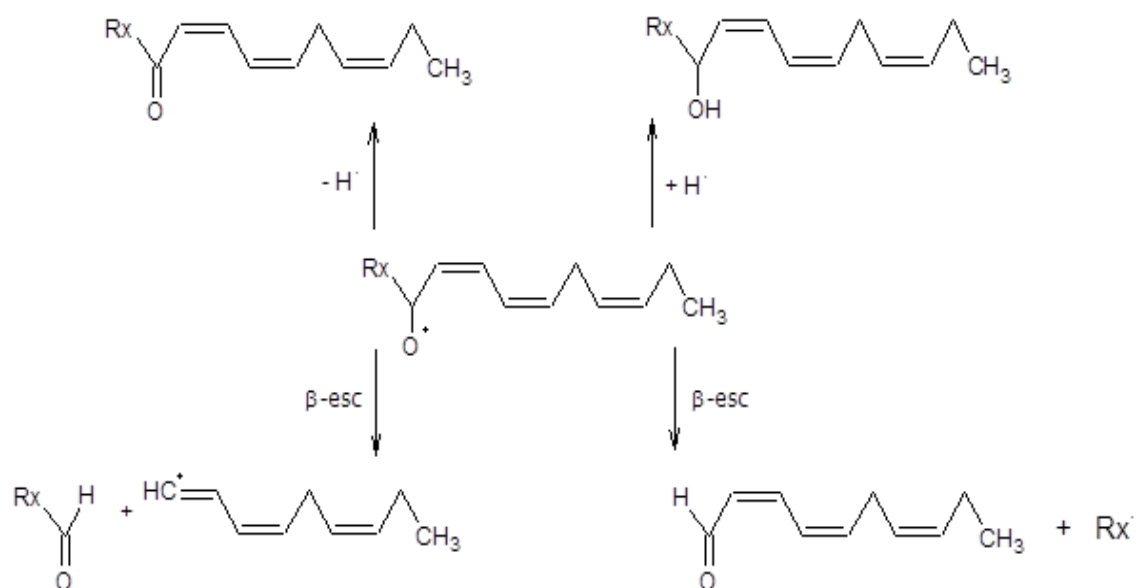


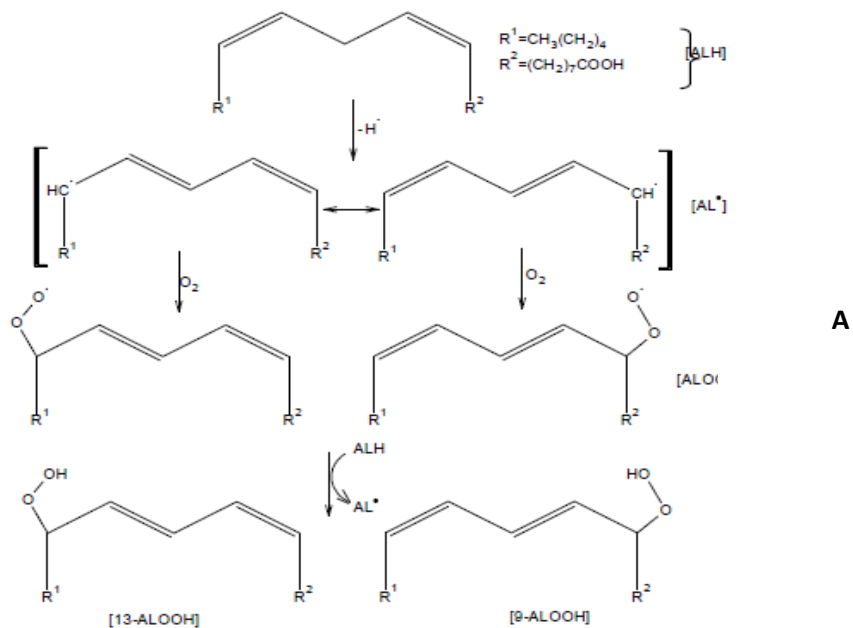
Figura 11. Productos finales generados durante el proceso de peroxidación lipídica.

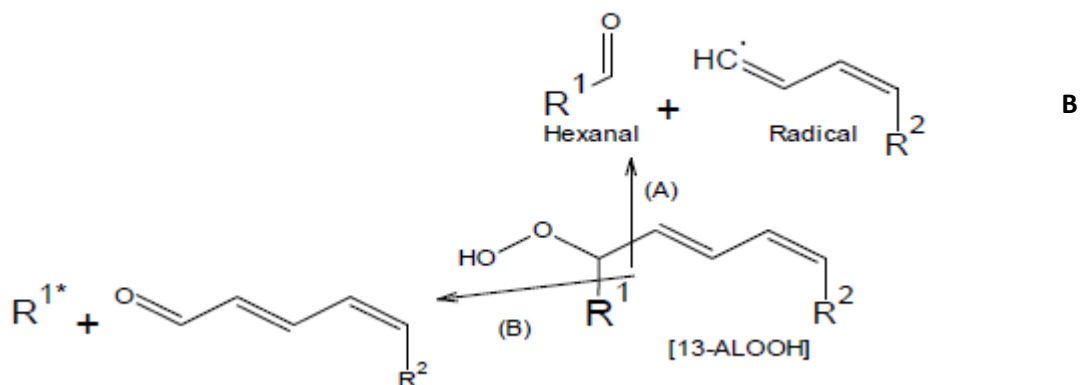


De acuerdo con este proceso, por ejemplo, uno de los productos finales mayoritarios de degradación del ácido linoléico es el hexanal [59]. El ALH posee

enlaces dobles en las posiciones 9 y 12, que debilitan el enlace C-H metilénico (76 kcal/mol de energía de enlace), con respecto a un hidrógeno en una cadena saturada (96,3 kcal/mol de energía de enlace) y facilitan la abstracción del hidrógeno del grupo metilénico del C11, para formar el respectivo radical (AL•), estabilizado por deslocalización del electrón a través de los cinco átomos de carbono (**Figura 12 A**) [60]. La distribución electrónica en el AL• permite la formación de los híbridos de resonancia conjugados. En presencia de oxígeno triplete ($^3\text{O}_2$) se forman los correspondientes radicales peroxi 9- y 13-ALOO•, los cuales reaccionan con el ácido graso ALH para propagar la reacción y generar los 9- y 13-hidroperóxidos, respectivamente. Los hidroperóxidos formados se descomponen para dar compuestos de bajo peso molecular.

Figura 12. Generación del hexanal durante la oxidación del ácido linoléico; **A.** Formación de hidroperóxidos a partir de la oxidación del ácido linoléico; **B.** Formación del hexanal, mediante la escisión β - del 13-hidroperóxido [13].





El hexanal es el producto secundario más abundante formado a partir de la oxidación del ALH, posiblemente, por la vía de escisión β - del 13-hidroperóxido con la formación de un radical de corta vida y el grupo carbonilo [60]. La **Figura 12 B** muestra las dos posibilidades (A y B) de la escisión de los hidroperóxidos [60]. Sin embargo, el hexanal no es el único compuesto carbonílico formado.

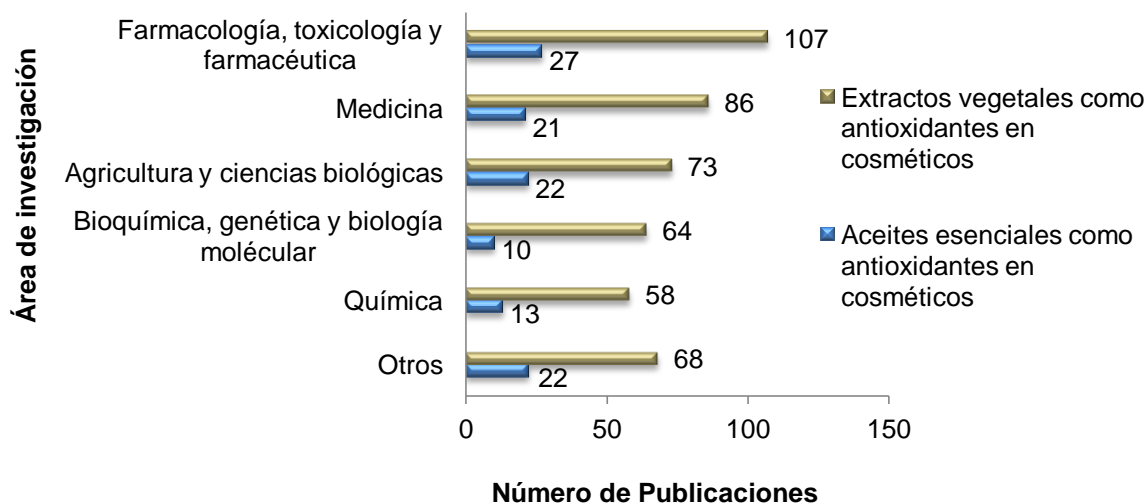
2. CIENCIOMETRÍA

Con el objetivo de analizar el estado de la producción científica sobre la utilización de los AE, extractos de plantas y sus principales constituyentes como antioxidantes en cosméticos, se llevó a cabo un estudio cuantitativo, utilizando la base de datos *Scopus (Elsevier)*.

Los principales estudios de las propiedades biológicas de los metabolitos secundarios, han sido desarrollados por las áreas de farmacología, toxicología y farmacéutica (Véase **Figura 13**); y publicados en revistas como *Journal of Ethnopharmacology*, *Journal of Natural Products*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*.

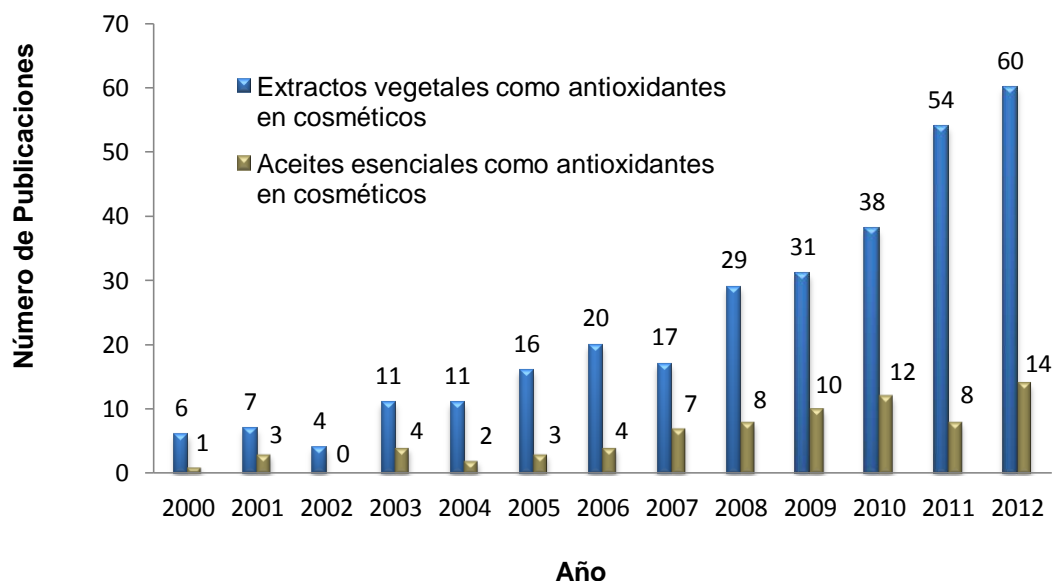
En la **Figura 14**, se observa un incremento, en el transcurso de los años, del número de publicaciones sobre a la aplicación de AE y extractos en productos cosméticos. La revisión se hizo para los últimos 18 años y mostró, una tendencia creciente de la actividad científica en el estudio de extractos vegetales en cosméticos. Dentro de dicho estudio, la investigación de las propiedades biológicas de compuestos fenólicos, es un tema que se relaciona con la actividad antirradicalaria en múltiples artículos publicados y en revistas científicas, como *Food Chemistry Food Research International*, *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, entre otras.

Figura 13. Número de artículos científicos publicados en diferentes áreas de investigación, sobre aceites esenciales y extractos vegetales como antioxidantes en cosméticos. Fuente: Base de datos: *Scopus (Elsevier)*. Fecha de consulta 25 de septiembre de 2011. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABSTR-KEY (*Antioxidant essential oil*) y TITLE-ABSTR-KEY (*Antioxidant plant extract*). Periodo de observación: 1990-2012.



En el análisis cuantitativo, se destacaron algunos artículos referentes al tema de investigación, por ejemplo: Shahidi *et al.* [61], demostraron que el efecto antioxidante de las plantas aromáticas se debía a la presencia de compuestos fenólicos y, así mismo, dependía del número de grupos hidroxilos.

Figura 14. Número de publicaciones, por año, sobre el uso de los AE y extractos vegetales en productos cosméticos. Fuente: Base de datos: *Scopus (Elsevier)*. Fecha de consulta: 25 septiembre de 2011. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABSTR-KEY (*essential oil in cosmetics*) y TITLE-ABSTR-KEY (*plant extract in cosmetics*). Periodo de observación: 1993-2012.



Por otro lado, Milos *et al.* [62] encontraron que el AE del orégano, rico en compuestos fenólicos como el timol y el carvacrol, tuvo un efecto antioxidante considerable en el proceso de oxidación de la manteca de cerdo. Igualmente, otros estudios establecieron que el timol y el carvacrol inhiben la peroxidación dependiendo de sus concentraciones [63,64]. También, se encontró que el AE de orégano era más eficaz, que sus componentes activos principales (timol y carvacrol), lo que sugiere un posible efecto sinérgico entre sus componentes [65-

67]. Milos y Makota [63], efectivamente lograron demostrar efecto sinérgico entre las mezclas de estos compuestos antioxidantes.

Actualmente, se observa una tendencia hacia la aplicación y desarrollo de productos de origen natural. El interés por la búsqueda de nuevos compuestos antioxidantes presentes en plantas aromáticas, conduce a la evaluación confiable de la capacidad antioxidante por diferentes métodos. Por ejemplo, Huang *et al.* [68], explicaron que con diferentes ensayos (ORAC, TRAP, TEAC, FRAP, TOSC, DPPH), se obtienen diferentes valores de capacidad antioxidante, según las condiciones experimentales de trabajo. Mientras tanto, Lado *et al.* [69], determinaron la capacidad antioxidante de los principales componentes de los AE de algunas plantas (alcaravea, manzanilla, cilantro, eucalipto, eneldo, hinojo, hisopo, enebro, lavanda, perejil, menta, romero, salvia, milenrama y la moscatel salvia) usando el ensayo FRAP. El felandreno mostró la capacidad antirradicalaria más alta (65.438 ± 0.166 mmol/kg). [69]

Saija *et al.* [70], demostraron que la quercetina exhibe un alto poder antioxidante y antirradicalario frente a radicales peróxido, hidroxilo y aniones superóxidos, en comparación con otros tres flavonoides estudiados, entre ellos la naringenina. Los resultados obtenidos se validaron en los estudios realizados por Bors *et al.* [71], Sichel *et al.* [72], Ratty *et al.* [73], quienes sugirieron una relación entre el poder antioxidante y las características estructurales de los flavonoides. La actividad antioxidante está relacionada con tres requisitos: **1.** Presencia de un grupo *o*-hidroxilo (catecol) en el anillo B; **2.** La existencia de una conjugación entre el doble enlace 2,3 con el grupo 4-oxo; **3.** La presencia de tres grupos hidroxilos en las posiciones 7-, 5-, 3-. Finalmente, la quercetina cumple con todas estas condiciones estructurales.

En los extractos etanólicos de propoleo uruguayo, Paulino *et al.* [74] identificaron mediante HPLC en fase reversa ocho flavonoides, entre ellos: luteolina, quercetina y pinocembrina. También, determinaron la capacidad antioxidante de estos compuestos, por los ensayos DPPH y MLP; observaron, que la quercetina presentó mayor capacidad antirradicalaria comparada con la luteolina y la pinocembrina. Otros estudios, también, reportaron que la quercetina exhibía una buena capacidad antioxidante. Esto se debe a los mecanismos estudiados anteriormente, tales como la quelación de metales, atrapamiento de radicales; inhibición de enzimas o la acción de enzimas protectoras [75-81].

Por otro lado, investigaciones basadas en la similitud estructural de los flavonoides con el α -tocoferol (anillo aromático con grupo OH), plantea la hipótesis de que flavonoides, como la naringenina, podrían actuar de manera similar al α -tocoferol e imitar su función como antioxidante en membranas celulares. El estudio se realizó en microsomas hepáticos (fragmentos de células hepáticas) de ratas. En general, se comprobó, que los flavonoides sí pueden simular la capacidad antioxidante del α -tocoferol y estas propiedades podrían aprovecharse para prevenir enfermedades cardiovasculares [82-85].

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1 REACTIVOS, SOLVENTES Y MATERIAL DE REFERENCIA CERTIFICADO

3.1.1 Reactivos

Los reactivos y patrones utilizados en el trabajo fueron adquiridos de *Sigma-Aldrich* (St. Louis, EE.UU.): Trolox® (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico; 97%), α -tocoferol (97%), butilhidroxitolueno (BHT, 99%), timol (99%), carvacrol (98%), pinocembrina (95%), luteolina (98%), naringenina (95%) ABTS (sal de diamonio del ácido 2,2'-azino-*bis*-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico; 98%), fluorescina (FL), persulfato de potasio (PDS, 97%), pentaflúorfenilhidrazina (97%). Los solventes metanol y etanol, de grado analítico, fueron obtenidos de Mallinckrodt Baker Inc. (J.T. Baker, Phillipsburg, EE.UU.); y el hexanal (98%), de Merck (Darmstadt, Alemania). El agua tipo I se obtuvo en un equipo Millipore, Synergy UV (Millipore S.A., Molsheim, Francia).

3.1.2 Material vegetal

El material vegetal se cultivó en una parcela de 25 m² y fue recolectado (febrero de 2012) en el Complejo Agroindustrial Piloto del Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales (CENIVAM), en la Universidad Industrial de Santander. Todas las plantas se identificaron debidamente en el Herbario Nacional

Colombiano del Instituto de Ciencias Naturales, en la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá (**Tabla 1**).

Tabla 1. Identificación taxonómica y número de *voucher* de las especies bajo estudio.

Especie	N° COL*
<i>L. origanoides</i> , quimiotipo felandreno	519798
<i>L. origanoides</i> , quimiotipo timol	519799
<i>L. origanoides</i> , quimiotipo carvacrol	512075

* La identificación taxonómica fue realizada por el Dr. José Luís Fernández (UN, Bogotá).

3.2 OBTENCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS POR MWH

Los aceites se obtuvieron por hidroddestilación asistida por la radiación de microondas. El material vegetal, previamente pesado, se sometió al proceso de extracción en un equipo tipo *Clevenger* con reservorio de destilación *Dean-Stark*, adaptado a un sistema de calentamiento por la radiación de microondas en un horno convencional (SAMSUNG, modelo MS-1242zk, 1200 W de potencia); cada balón fue sometido a una radiación de aproximadamente 720 W, en tres intervalos, cada uno de 15 min, con un tiempo de reposo de 2 min, entre éstos [86]. Al finalizar el proceso, el AE se separó por decantación, y la humedad se eliminó con el sulfato de sodio anhidro, Na₂SO₄. La destilación se realizó por triplicado, y los AE obtenidos se pesaron para calcular su rendimiento, con base en el peso inicial de material vegetal. Posteriormente, se almacenaron en tubos de ensayo, protegidos de la luz, a una temperatura de 4 °C. El montaje del equipo de destilación se observa en la **Figura 15**.

Figura 15. Montaje de hidrodestilación asistida por la radiación de microondas.



Fotografía tomada por Laura G. Guarguati. Lugar: CENIVAM, UIS. Fecha: 17 Junio de 2012.

3.3 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CON SOLVENTE

Para la extracción de los compuestos fenólicos se siguió el procedimiento descrito por Hertog *et al.* [87], sin su posterior hidrólisis. Al material vegetal, previamente picado y seco (0,5 g), se le adicionó una solución acuosa de metanol al 62,5 % (40 mL). Posteriormente, la mezcla de extracción se colocó en ultrasonido durante 45 min, en intervalos de 15 minutos. Luego, el extracto obtenido se filtró y se llevó a sequedad bajo corriente de nitrógeno.

3.4 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

3.4.1 Análisis por GC-MS. La separación e identificación de los metabolitos secundarios de los AE se realizó en un cromatógrafo *Agilent Technologies 6890*

Series (Véase **Figura 16**) (*Agilent*, Palo Alto, California, EE.UU.), acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5973*. Para la separación de los compuestos se utilizaron dos columnas, una, con la fase estacionaria (f.e.) apolar de 5%-fenil-poli(metilsiloxano) (DB-5MS, *J & W Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.) de 60 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25 μm , d_f , y, la otra, con f.e. polar de poli(etilenglicol) (DB-WAX, *J & W Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.), de 60 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25 μm , d_f . Como gas de arrastre se empleó helio (99.995%, gas AP, Linde, Colombia), con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 16.47 psi, y un flujo volumétrico de 1 mL/min. En el inyector la temperatura fue de 250 °C; la inyección se realizó en el modo *Split* (1:30), y un volumen de inyección de 1 μL .

Los espectros de masas se obtuvieron por impacto de electrones con la energía de 70 eV. Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia permanecieron a 230 y 285 °C, respectivamente.

Figura 16. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Series GC System*, acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 5973 Network*, equipado con un puerto de inyección *split/splitless* y un inyector automático *Agilent 7863 Series*.



Fotografía tomada por Laura G. Guarguatif. Lugar: Laboratorio de Instrumentación, CENIVAM, UIS.
Fecha: Junio de 2012.

Los metabolitos presentes en los AE se identificaron por medio de los índices de retención lineales, calculados utilizando los tiempos de retención de hidrocarburos C₁₀-C₂₅, que se analizaron bajo las mismas condiciones operacionales que las muestras de aceites esenciales, según la **Ecuación 1**:

$$LRI = 100 \times n + 100 \left[\frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \right] \quad \text{Ecuación 1}$$

Dónde:

LRI: Índice de retención lineales del compuesto de interés;

n y **N**: Número de átomos de carbono del *n*-hidrocarburo que eluye antes y después del compuesto de interés;

t_{Rx}: Tiempo de retención del compuesto de interés;

t_{RN} y **t_{Rn}**: Tiempos de retención de los *n*-hidrocarburos que eluyen antes y después del compuesto.

Los espectros de masas obtenidos experimentalmente se compararon con los espectros almacenados en las bases de datos ADAMS, NIST y WILEY, utilizando el software *MS-ChemStation* E. 02. 02. del equipo cromatográfico *Agilent Technologies*.

3.4.2 Análisis por GC-FID. La cuantificación de los metabolitos identificados se realizó mediante estandarización interna, empleando *n*-tetradecano, como patrón interno, según la **Ecuación 2**:

$$C_x = \frac{C_{Istd} * A_x}{A_{Istd}}$$

Ecuación 2

Donde:

C_x: Concentración (g/L) del analito en la muestra;

C_{Istd}: Concentración (g/L) del patrón interno (*istd*);

A_x: Área del pico cromatográfico del analito, cuentas;

A_{Istd}: Área del pico cromatográfico del patrón interno, cuentas.

La cuantificación se realizó en un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890N* (*Agilent*, Palo Alto, California, EE.UU.), acoplado a un detector de ionización en llama (FID) equipado con un puerto de inyección *split/splitless* y un inyector automático *Agilent 7683B Series* (Véase, **Figura 17**)

La separación de los compuestos se llevó a cabo en una columna capilar con f.e. apolar 5%-fenil-poli (metilsiloxano) (DB-5MS, J & W *Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.) de 60 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25 µm, d_f. Se empleó helio (99.995%, gas AP, Linde, Colombia) como gas de arrastre, con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 16.47 psi, y una velocidad volumétrica de flujo de 1 mL/min. La temperatura del inyector fue de 250 °C, modo de inyección *split* (1:30) y un volumen de inyección de 1 µL. La temperatura del horno cromatográfico se programó así: el calentamiento inició a 45 °C, temperatura que permaneció constante durante 5 min; luego, la temperatura se elevó hasta 250 °C, a una tasa de calentamiento de 5 °C/min. La temperatura del detector fue de 280 °C; flujos de 300 mL/min de aire (99.005%, zero AP, Linde, Colombia), 30 mL/min de hidrógeno (99.995%, gas AP, Linde, Colombia) y 30 mL/min de nitrógeno (99.995%, gas AP, Linde, Colombia).

Figura 17. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890N* (*Agilent*, Palo Alto, California, EE.UU.), acoplado a un detector de ionización en llama (FID), equipado con un puerto de inyección *split/splitless* y un inyector automático *Agilent 7683B Series*.

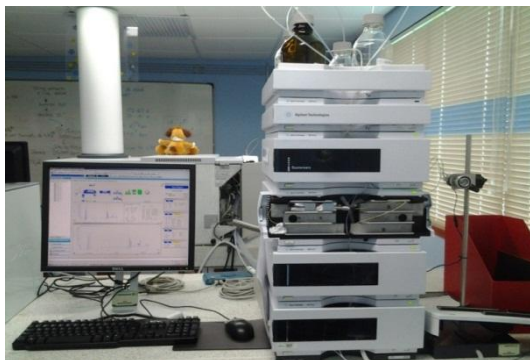


Fotografía tomada por Laura G. Guarguati. Lugar: Laboratorio Instrumental, CENIVAM, UIS. Fecha: Agosto de 2012.

3.4.3 Análisis por HPLC-DAD. El análisis cromatográfico se realizó en un cromatógrafo *Agilent Technologies 1200*, con una bomba cuaternaria *Agilent Technologies G1354A*, un inyector automático y un detector UV-Vis de arreglo de diodos (DAD) *G1315B* (Véase **Figura 18**).

La separación de los compuestos antioxidantes se realizó en una columna apolar Kinetex C18 (4.6 mm × 100 mm, 2.5 μm). El procesamiento de los datos se realizó a través del software *Agilent Technologies ChemStation*, Versión B.04.02 (SP1). La fase móvil consistió en ácido acético, al 0.3 %, y acetonitrilo. La temperatura de la columna fue de 35 °C, con un flujo volumétrico de 1 mL/min, y un volumen de inyección de 20 μL. Los cromatogramas se registraron a 210 nm.

Figura 18. Cromatógrafo *Agilent Technologies* 1200, con bomba cuaternaria *Agilent Technologies* G1354A, equipado con inyector automático y acoplado a un detector UV-Vis de arreglo de diodos (DAD) G1315B.



Fotografía tomada por Laura G. Guarguati. Lugar: CENIVAM, UIS. Fecha: Agosto de 2012.

La identificación de los compuestos antioxidantes de los extractos se llevó a cabo comparando sus tiempos de retención (t_R) y los espectros UV-Vis con los de una mezcla de sustancias de referencia certificadas, catalogadas como antioxidantes, entre ellos: quercetina, apigenina, kaempferol, luteolina, naringenina, pinocembrina, ácidos carnósico, rosmarínico, ursólico, caféico, *p*-cumárico); ácidos fenólicos (vanílico, ferúlico, cinámico, gálico, *p*-hidroxibenzoico); y catequinas (-)-epigallocatequina (EGC), (+-)-catequina (C), (-)-epigallocatequina galato (EGCG), (-)-epicatequina (EC), (-)-epicatequina galato (ECG).

3.4.4 Análisis de ácidos grasos (FAME). El análisis de los ácidos grasos (FA) del aceite de seje, se llevó a cabo mediante la obtención de sus ésteres metílicos (FAME), según la norma ISO 5509 y 5508, *Animal and Vegetables Fats and Oil – Analysis by GC of Methyl Esters of Fatty Acids*.

Se tomaron 100 mg del aceite de seje, se adicionaron 5 mL del complejo trifluoro de boro al 14% en metanol. La mezcla, con agitación, se sumergió en un baño de

aceite a 85-90 °C durante 45 min, tiempo optimizado previamente en el Laboratorio de Cromatografía CROM-MASS. Posteriormente, la muestra se retiró del baño de aceite y se dejó reposar durante 5 min. Finalmente, se realizó la extracción de los FA, en forma de sus metilésteres (FAME) con 3 x 1 mL de *n*-hexano. Del extracto orgánico, se tomaron 0.5 mL, que se aforaron a 1 mL con *n*-hexano. De la solución final, se inyectó 1 µL en el GC/FID.

La identificación de los FA en el aceite de seje, se realizó por comparación de los t_R de sus ésteres metílicos, con los de las mezclas certificadas de FAME GLC10, GLC50, GLC70, GLC80 7 GLC100, adquiridas de Matreya, Inc. (Pensylvania, EE.UU.). Los patrones se analizaron bajo las mismas condiciones cromatográficas, que la muestras de aceite de seje. La identificación de los FA adicionalmente se confirmó con base en sus espectros de masas.

3.5 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS

3.5.1 Evaluación de la capacidad antirradicalaria de los AE y extractos de *Lippia origanoides*. La determinación de la capacidad antioxidante de compuestos fenólicos de alta pureza, AE y extractos (SE) se efectuó siguiendo dos metodologías diferentes, en un lector de microplacas *Turner Biosystems Inc., Modulus™ II Microplate Multimode Reader*, con microplacas de poli(estireno) de 96 pozos y equipado con módulos de absorbancia UV-Vis y fluorescencia (*Sunnyvale, CA, EE.UU.*) (Véase **Figura 19**). Las mediciones se realizaron con cada una de las metodologías (capacidad de absorción del oxígeno radical, y capacidad antioxidante total equivalente al Trolox®), por triplicado, y los resultados se expresaron como la media ± desviación estándar.

Figura 19. Lector de microplacas *Turner Biosystems Inc., Modulus™ II Microplate Multimode Reader*, con microplacas de poli(estireno) de 96 pozos, que se encuentra equipado con módulos de absorbancia UV-Vis y fluorescencia (*Sunnyvale, CA, EE.UU.*).



Fotografía tomada por Laura G. Guarguati. Lugar: Laboratorio Instrumental, CENIVAM, UIS. Fecha: 13 de septiembre de 2012.

3.5.1.1 TEAC o ensayo de decoloración del catión-radical ABTS⁺. La determinación de la capacidad antioxidante de los AE y extractos (SE), de las sustancias control (BHA, BHT, vitamina E) y patrones de fenoles se realizó con base en el procedimiento reportado por Arias [88], mediante espectroscopía UV-VIS, a 750 nm, en un lector de microplacas *Turner Biosystems Inc., Modulus™ II Microplate Multimode Reader*, con microplacas de poli(estireno) de 96 pozos. Inicialmente, se preparó el catión-radical ABTS, tras la mezcla de una solución de ABTS con persulfato de potasio (PDS). Esta se homogeneizó con ultrasonido aplicado y se dejó reaccionar a 4 °C durante 24 h, en ausencia de luz.

Una vez formado el radical, éste se adicionó a soluciones de diferentes concentraciones de AE, extracto, sustancia control o patrón de fenol, con una absorbancia de 0.700 ± 0.03 . Fue necesario realizar una dilución de la muestra para garantizar, que se obtuvieran porcentajes de inhibición entre el 10 y el 80%

del blanco de la absorbancia. De acuerdo con la **Ecuación 3**, se calculó el porcentaje de inhibición de los AE, extractos (SE) y sustancias control.

$$\text{Inhibición de } A_{\lambda=750} (\%) = (1 - A_f / A_0) \times 100$$

Ecuación 3

Donde:

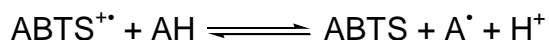
A: Porcentaje de inhibición.

λ: Longitud de onda (nm).

A_f: Es la absorbancia medida 30 min después de la adición del posible antioxidante.

A₀: Es la absorbancia del blanco de reacción (catión-radical sin inhibir).

La capacidad antioxidante se determinó mediante la disminución en la coloración azul-verdosa del catión-radical ABTS^{•+}, que, al reaccionar con el posible antioxidante, produce el ABTS neutro, que es incoloro, así:



Los valores de la capacidad antioxidante de las muestras se expresaron como μmol Trolox[®]/ g muestra. Estos valores se calcularon como la relación entre las pendientes de las gráficas de inhibición (%) *versus* la concentración del antioxidante evaluado y el estándar Trolox[®].

3.5.1.2 Capacidad de absorción del oxígeno radical (ORAC). La capacidad antioxidante de los AE, extractos, sustancias control y sustancias patrón de fenoles, se midió evaluando la inhibición en la disminución de la fluorescencia de la fluoresceína, que se utilizó como indicador molecular y blanco de ataque de los radicales peroxilo generados por el compuesto AAPH [88].

Se realizaron diluciones de las muestras, para garantizar que la reacción llegará a su final, es decir, que se alcanzará un valor de fluorescencia final menor del 5% del valor inicial. La respuesta a la capacidad antioxidante de las muestras fue el área bajo la curva (ABC) de éstas, con respecto a la curva del blanco, que representa la disminución de la fluorescencia de la FL, la cual es directamente proporcional al valor ORAC expresado en μmol de Trolox[®]/g de muestra. Las mediciones se realizaron en el lector de microplacas, empleando el módulo de fluorescencia con filtros, que manejan longitudes de onda de 490 nm de excitación y 510-570 nm de emisión.

3.5.2 Peroxidación lipídica

A los AE y extractos (SE) de la especie *L. origanoides* y sustancias de control, a saber: BHT y α -tocoferol; se les midió el efecto protector contra el deterioro oxidativo de una matriz lipídica, rica en vitamina F (aceite de seje), sometido a radiación UVA. El estudio se realizó mediante el seguimiento del hexanal, producto final principal de la degradación oxidativa del ácido linoléico presente en el aceite de seje.

3.5.2.1 Análisis por GC-ECD del derivado PFPH-hexanal. El análisis del derivado PFPH se realizó en un cromatógrafo de gases *Hewlett-Packard* (Palo Alto, CA, EE.UU.), HP 6890 *Plus* (Véase **Figura 20**), acoplado a un detector de captura de electrones (ECD, ^{63}Ni , 280 °C), equipado con puerto de inyección *split/splitless* (se inyectó en modo *split* 1:10). Se empleó una columna HP-5 de 30 m x 0.25 mm D.I x 0.33 μm , d_f , 5%-fenil-poli(dimetilsiloxano). Se utilizó helio como gas de arrastre (99.995% Aga-fano S.A), con flujo volumétrico de 1 mL/min y como gas auxiliar argón/metano (9:1).

Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 260 y 280 °C, respectivamente. La temperatura fue programada de la siguiente manera: 100 °C (5 min) hasta 250 °C (2 min) con un flujo de 10 °C/min.

Figura 20. Cromatógrafo de gases *Hewlett-Packard* (Palo Alto, CA, EE.UU.), HP 6890 *Plus*, acoplado a un detector de captura de electrones (ECD, ^{63}Ni), equipado con puerto de inyección *split/splitless*.



Fotografía tomada por Laura G. Guarguati. Lugar: Centro de Cromatografía y Espectrometría de Masas, CROM-MASS, Laboratorio Instrumental, CENIVAM, UIS. Fecha: 5 de Octubre de 2012.

3.5.2.2 Calibración externa del derivado PFPH del hexanal. Para cuantificar el hexanal generado durante la degradación oxidativa, por la acción de la radiación UV en el sistema lipídico de aceite de seje, se recurrió al método analítico cuantitativo de calibración externa. Se preparó una solución "stock" del hexanal en metanol (500 ppm). La fibra de PDMS/DVB de 65 μm , se expuso a una solución acuosa de PFPH (2 mL, 500 ppm, 1000 rpm, 10 min). Después de su saturación con PFPH, la fibra se expuso al *headspace* de las diferentes diluciones de la solución patrón del hexanal (0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 ppm). Los derivados formados sobre la fibra, se desorbieron, durante 10 minutos a 250°C, en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases. Los valores de concentración, tiempo de retención (t_R) y las áreas cromatográficas de cada derivado, se utilizaron para calcular la reproducibilidad y repetitividad de las áreas cromatográficas de sus respectivas concentraciones de la solución patrón de hexanal. Para esto, se determinaron el valor promedio (\bar{X}), la desviación estándar (S) y el porcentaje del coeficiente de variación (CV) de las áreas cromatográficas de la señal del hexanal, usando las **Ecuaciones 4-6**:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Ecuación 4

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{(n - 1)}}$$

Ecuación 5

$$\%CV = \frac{S}{\bar{X}} * 100$$

Ecuación 6

Donde:

\bar{X} : Valor promedio de la variable X (área);

x_i : Valor "iésimo" obtenido para la variable X en una medición.

3.5.2.3 Peroxidación lipídica en el aceite de seje sometido a radiación UV.

La degradación oxidativa del aceite de seje, producida por la exposición a la radiación UVA, se evaluó con 400 mg del aceite de seje en tubos cónicos de poli(propileno), sellados herméticamente con un séptum, papel parafina y teflón, para evitar, que algunos de los compuestos volátiles generados durante la irradiación, se escaparan. La radiación fue emitida por un reactor UV, desarrollado por Contreras [34] (Véase **Figura 21**). Las muestras se colocaron en el portamuestras del reactor y se irradiaron durante 12 h, manteniendo una temperatura de 55°C, para garantizar la presencia de los compuestos antioxidantes de interés. Luego, las muestras se retiraron del reactor y se llevaron a enfriamiento a 4°C, en una nevera industrial INDUFRIAL. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada una de las muestras.

Figura 21. Reactor UV, equipado con un refrigerante y 6 lámparas fluorescentes F6T5BLB de 16 x 225.1 mm y 6 Watt.



Fotografía tomada por Laura G. Guarguatif. Lugar: Laboratorio Instrumental, CENIVAM, UIS. Fecha: Noviembre de 2012.

PASO 1: Pre-equilibrio de la PFPH. En un vial ámbar de 4.5 mL, sellado con teflón, se adicionaron 2 mL de la solución de PFPH (500 ppm), a temperatura ambiente y agitación magnética (1000 rpm), durante 5 min.

PASO 2: Saturación de la fibra. La fibra de PDMS/DVB, se expuso al espacio de cabeza de la solución de PFPH durante 10 min.

PASO 3: Pre-equilibrio de la muestra. Simultáneamente a la saturación de la fibra con PFPH, se colocó la muestra, previamente refrigerada, en un baño de agua a 40 °C durante 10 min, con agitación magnética.

PASO 4: Derivatización del hexanal en la muestra. Después de alcanzar el pre-equilibrio de la muestra, se expuso la fibra saturada con la PFPH en el espacio de cabeza de la muestra durante 40 min.

PASO 5: Desorción de los compuestos volátiles. La desorción de los derivados hidrazónicos se realizó en el puerto de inyección del GC- μ ECD, a 260 °C, durante 10 min.

3.5.2.4 Evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro* de los AE y extractos de *L. origanoides*, quimiotipos timol, carvacrol y felandreno, en el aceite de seje sometido a radiación UV.

Se pesaron 2 mg de cada muestra junto con 398 mg de aceite de seje en tubos cónicos de poli (propileno), para alcanzar una concentración de 0.5% p/p. En el caso de mezclas, éstas se prepararon en proporción 1:1; a cada una de ellas se les realizó el procedimiento descrito en la **Sección 3.5.2.2**. Las muestras fueron irradiadas en el reactor UV, siguiendo la metodología descrita en la **Sección 3.5.2.3**. El grado de protección (%GP) de las muestras en el sistema lipídico, *i.e.*,

aceite de seje, contra su degradación oxidativa, se calculó utilizando la **Ecuación 7**.

$$\%GP = \left[\left(\frac{A_o - A_x}{A_o} \right) * 100 \right] \quad \text{Ecuación 7}$$

Dónde:

A_o: Área cromatográfica del pico del hexanal medida en el sistema lipídico sometido a radiación UV, sin antioxidante;

A_x: Área cromatográfica del pico del hexanal medida en el sistema lipídico sometido a radiación UV, con antioxidante;

El grado de protección se determinó con base en la cantidad del hexanal generado, que es uno de los aldehídos que se producen en mayor proporción durante la peroxidación lipídica del ácido linoléico.

3.5.2.5 Validación del sistema lipídico modelo. La validación consistió en evaluar, también, los efectos protectores de dos antioxidantes sintéticos, el α -tocoferol (vitamina E) y el BHT, a los cuales se les realizó el procedimiento descrito en las **Secciones 3.5.2.2 y 3.5.2.3**.

4. 1 ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 RENDIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Lippia origanoides*

Los AE se obtuvieron por la técnica de MWHD, bajo las condiciones descritas en el **Numeral 3.2**. En la **Figura 22**, se reporta el rendimiento de extracción de los AE con base en el peso inicial del material vegetal fresco.

El rendimiento de extracción se encontró dividiendo el peso del AE obtenido, sobre el peso de material vegetal (MV) introducido en el balón de extracción. Se utilizó la siguiente ecuación:

$$Rendimiento = \frac{W_{AE}}{W_{MV}} \times 100\%$$

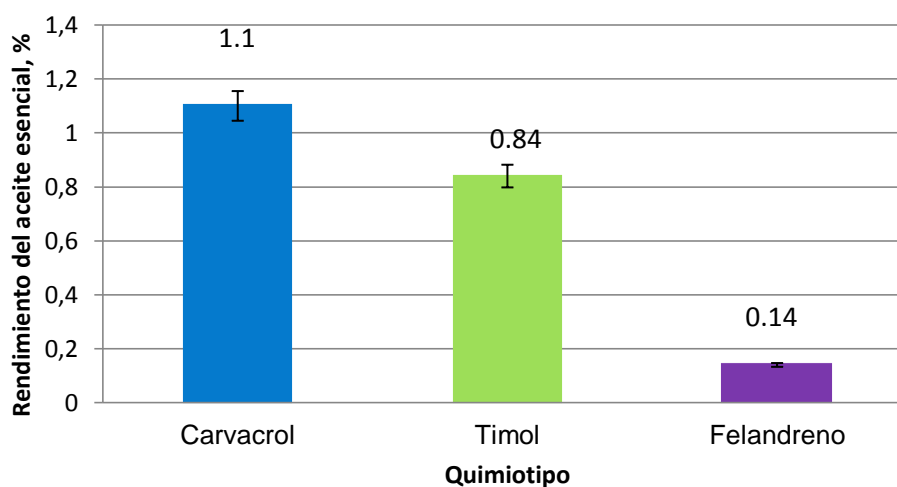
Donde:

W_{AE} = Peso del aceite esencial (g); W_{MV} = Peso del material vegetal (g).

El AE de *Lippia origanoides*, quimiotipo carvacrol, presentó mayor rendimiento de extracción ($1.1 \pm 0.2 \%$), con respecto a los quimiotipos timol ($0.84 \pm 0.04\%$) y felandreno ($0.14 \pm 0.01\%$). Este último presentó menor porcentaje de obtención. Oliveira *et al.* [89], estudiaron la composición química del AE rico en carvacrol de la

especie *Lippia origanoides* cultivada en Oriximina, Brasil y encontraron su rendimiento de 1%, que fue semejante al que se logró en el presente trabajo con la planta estudiada, correspondiente al quimiotipo carvacrol.

Figura 22. Rendimientos de los AE obtenidos por MWHD, de los tres quimiotipos de *Lippia origanoides* bajo estudio, colectados en el Complejo Agroindustrial Piloto CENIVAM.



4.2 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS

4.2.1 Identificación de los metabolitos secundarios volátiles de *Lippia origanoides*, aislados por MWHD. La identificación preliminar de los componentes de los AE aislados de la especie *L. origanoides*, quimiotipos timol, carvacrol y felandreno, se realizó con base en sus índices de retención lineales (LRI) calculados experimentalmente en dos columnas, apolar (DB-5MS) y polar

(DB-WAX), y mediante la comparación de los espectros de masas experimentales y reportados en diferentes bases de datos (ADAMS, NIST y Wiley) (Véanse **Tablas 2-4**).

Estudios previos de diferentes muestras de AE de *L. origanoides* realizados por Morais *et al.* [90] y Gallino *et al.* [91], indicaron que sí existían diferentes quimiotipos para especies como ésta, de la misma forma, que le ocurría al *Origanum vulgare* (Fleisher *et al.* [92]), la *Lippia alba* (Matos *et al.* [93]; Zoghbi *et al.* [94]), entre otras, y que además, esta característica se debía a las condiciones del cultivo, que tenían la capacidad de afectar la producción de los metabolitos secundarios de las plantas (Edris *et al.* [95]). Finalmente, Santos *et al.* [96], apoyó la existencia de dos quimiotipos diferentes, timol y carvacrol, para la especie *Lippia origanoides*, de acuerdo con los estudios realizados a los AE de esta planta procedente del estado de Piauí y del estado Pará, en Brasil. Por otro lado, Galvis *et al.* [97], mediante el análisis GC-MS a los AE de la especie *L. origanoides*, encontraron tres quimiotipos, entre esos el timol; en el cual, se identificaron como componentes mayoritarios: timol (59,7%), carvacrol (12,2%), *p*-cimeno (8,8%) y γ -terpineno (4,5%).

En el AE de *L. origanoides*, quimiotipo timol, se identificaron 35 compuestos, que corresponden al 98.33% del área cromatográfica total. Dentro de la totalidad de metabolitos secundarios volátiles, se encontraron 5 mayoritarios, a saber: timol, β -mirceno, *p*-cimeno, γ -terpineno, carvacrol y *trans*- β -cariofileno, que corresponden al 85.48% del área cromatográfica total. Además, el 78.73% corresponde a los monoterpenos oxigenados presentes en el AE.

Figura 23. Perfil cromatográfico típico del AE de *L. origanoides*, quimiotipo timol, obtenido por MWHD. Columna DB-5 (60 m). *Split* 1:30. La identificación de los picos aparece en la **Tabla 2**.

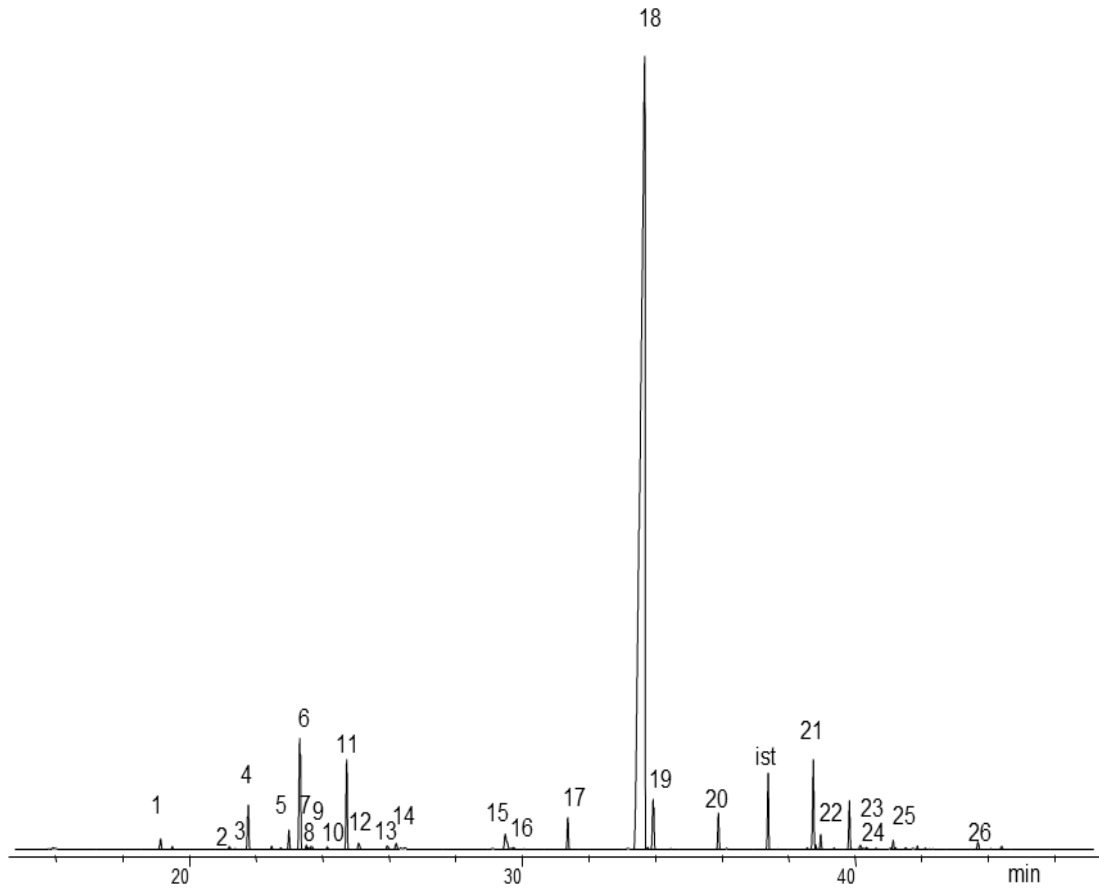


Tabla 2. Composición química del AE de *L. origanoides*, quimiotipo timol, obtenido por MWHD.

Nº Pico	LRI		Tipo	Cantidad relativa, % (± s, n=3)	Compuesto
	DB-5	DB-WAX			
1	930	1026	HM	0.50 ± 0.08	α-Tujeno
2	937	1029	HM	0.23 ± 0.01	α-Pineno
3	980	1451	HM	0.10 ± 0.04	1-Octen-3-ol
4	991	1168	HM	3.10 ± 0.25	β –Mirceno
5	1021	1186	HM	1.23 ± 0.10	α-Terpineno
6	1028	1279	HM	6.40 ± 0.52	p-Cimeno
7	1035	1203	HM	0.24 ± 0.04	Limoneno
8	1040	1218	HM	0.20 ± 0.01	β-Felandreno
9	--	1222	MO	0.13 ± 0.02	1,8 Cineol
10	1048	1254	HM	0.12 ± 0.08	trans-β-cimeno
11	1063	1252	HM	4.50 ± 0.37	γ-Terpineno
12	1075	1557	MO	0.41 ± 0.08	cis-Hidrato de sabineno
13	1090	1291	HM	0.10 ± 0.03	Terpinoleno
14	1101	1554	MO	0.29 ± 0.01	Linalol
15	1187	1603	MO	0.70 ± 0.50	Terpinen-4-ol
16	1189	1657	MO	0.60 ± 0.46	Umbellulona
17	1235	1601	MO	2.22 ± 0.06	Timol metil éter
18	1299	2193	MO	65 ± 5	Timol
19	1305	2224	MO	3.40 ± 0.70	Carvacrol
20	1358	1860	MO	1.80 ± 0.11	Acetato de timilo
21	1438	1619	HS	3.23 ± 0.05	trans-β-Cariofileno
22	1448	1599	HS	0.80 ± 0.10	trans-α-Bergamoteno
23	1475	1690	HS	1.87 ± 0.04	α-Humuleno
24	1510	1746	HS	0.13 ± 0.05	Biciclogermacreno
26	1518	1735	HS	0.48 ± 0.09	β-Bisaboleno
27	1603	2003	HS	0.55 ± 0.01	Óxido de cariofileno

HM: Hidrocarburo monoterpénico

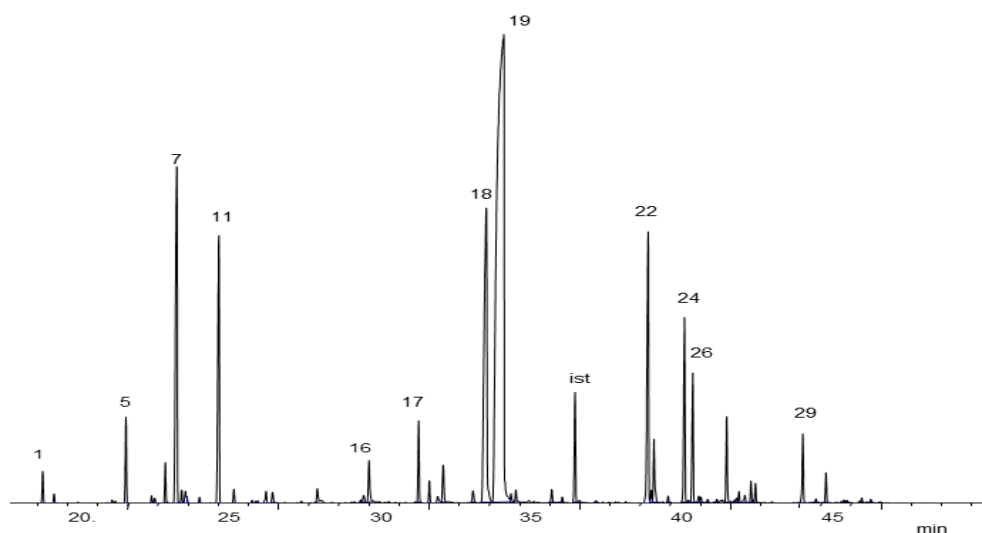
MO: Monoterpeno oxigenado

HS: Hidrocarburo sesquiterpénico

En el AE de *L. origanoides*, quimiotipo carvacrol, se identificaron 29 compuestos, que corresponden al 93.3% del área cromatográfica total. Dentro de la totalidad de metabolitos secundarios volátiles, se encontraron 5 mayoritarios, a saber: *p*-cimeno, γ -terpineno, timol, carvacrol y *trans*- β -cariofileno, que corresponden al 76% del área cromatográfica total. Además, el 68.37% corresponde a los monoterpenos oxigenados presentes en el AE.

Escobar *et al.* [98] encontraron, mediante un análisis cromatográfico, que dos de las muestras estudiadas de la especie *L. origanoides* presentaron un alto contenido de monoterpenos oxigenados; una de las muestras contenía: carvacrol (46,2%), *p*-cimeno (12%) y γ -terpineno (9,5%); la otra muestra contenía carvacrol (38,8%), timol (15,1%), γ -terpineno(12,6%) y *p*-cimeno (11,5%). Por otro lado, Acevedo *et al.* [99] identificaron como componentes mayoritarios, mediante GC-MS, carvacrol (44,4%), timol (14,3%), *p*-cimeno (9,5%) y γ -terpineno (10,0%).

Figura 24. Perfil cromatográfico típico del AE de *L. origanoides*, quimiotipo carvacrol, obtenido por MWHD. Columna DB-5 (60 m). *Split* 1:30. La identificación de los picos aparece en la **Tabla 3**.



Oliveira *et al.* [89] encontraron que el AE de *L. origanoides* presentaba como compuestos mayoritarios carvacrol (38.6%) y timol (18.5%). También, identificaron sesquiterpenos como el *trans*- β -cariofileno y monoterpénos como el *p*-cimeno y γ -terpineno; estos dos últimos, precursores biogénicos a través hidroxilación enzimática del timol y carvacrol, generalmente se encuentran como principales hidrocarburos monoterpénicos [100,101].

Tabla 3. Composición química del AE de *L. origanoides*, quimiotipo carvacrol, obtenido por MWHD.

Nº Pico	LRI		Tipo	Cantidad relativa, %			Compuesto
	DB-5	DB-WAX		(\pm s, n=3)			
1	930	1026	HM	0.90	\pm	0.40	α -Tujeno
2	937	1029	HM	0.30	\pm	0.10	α -Pineno
3	955	1070	HM	0.07	\pm	0.01	Canfeno
5	980	1451	HM	2.40	\pm	0.90	1-Octen-3-ol
6	1012	1173	HM	0.19	\pm	0.07	α -Felandreno
7	1028	1278	HM	12	\pm	4	<i>p</i> -Cimeno
8	1035	1205	HM	0.40	\pm	0.10	Limoneno
9	1040	1217	HM	0.40	\pm	0.10	β -Felandreno
10	1048	1255	HM	0.16	\pm	0.04	<i>trans</i> - β -Ocimeno
11	1063	1253	HM	8	\pm	2	γ -terpineno
12	1075	1555	MO	0.26	\pm	0.03	<i>cis</i> -Hidrato de sabineno
14	1101	1550	MO	0.43	\pm	0.05	Linalol
15	1106	1473	MO	0.18	\pm	0.04	<i>trans</i> -Hidrato de sabineno
16	1187	1603	MO	1	\pm	0.30	Terpinen-4-ol
17	1235	1600	MO	1.50	\pm	0.30	Timol metil éter

Continuación **Tabla 3**

Nº Pico	LRI			Cantidad relativa, %			Compuesto
	DB-5	DB-WAX	Tipo	(\pm s, n=3)			
18	1299	2191	MO	10	\pm	2	Timol
19	1305	2221	MO	41	\pm	4	Carvacrol
20	1356	1859	MO	0.26	\pm	0.06	Acetato de timilo
21	1358	--	MO	1.80	\pm	0.40	Acetato de carvacrilo
22	1438	1617	HS	5.00	\pm	0.80	<i>trans</i> - β -Cariofileno
23	1448	1597	HS	0.90	\pm	0.30	<i>trans</i> - α -Bergamoteno
24	1475	1689	HS	2.90	\pm	0.50	α -Humuleno
25	1510	1748	HS	1.40	\pm	0.20	Biciclogermacreno
26	1518	1733	HS	0.24	\pm	0.04	δ -Cadineno
27	1534	1847	HS	0.28	\pm	0.05	<i>cis</i> -Calameneno
28	1603	2003	HS	1.33	\pm	0.04	Óxido de cariofileno

HM: Hidrocarburo monoterpénico

MO: Monoterpeno oxigenado

HS: Hidrocarburo sesquiterpénico

En el AE de *L. origanoides*, quimiotipo felandreno, se identificaron 35 compuestos, que corresponden al 92.91% del área cromatográfica total. Dentro de los metabolitos secundarios volátiles, se encontraron 7 mayoritarios, a saber: α -felandreno, *p*-cimeno, limoneno, β -felandreno, timol, *trans*- β -cariofileno y α -humuleno, que corresponden al 60% del área cromatográfica total. Además, el 19.18% corresponde a los monoterpenos oxigenados presentes en el AE. La identificación de los picos aparece en la **Tabla 4**.

Figura 25. Perfil cromatográfico del AE de *L. origanoides*, quimiotipo felandreno, obtenido por MWHD. Columna DB-5 (60 m). *Split* 1:30. La identificación de los picos aparece en la **Tabla 4**.

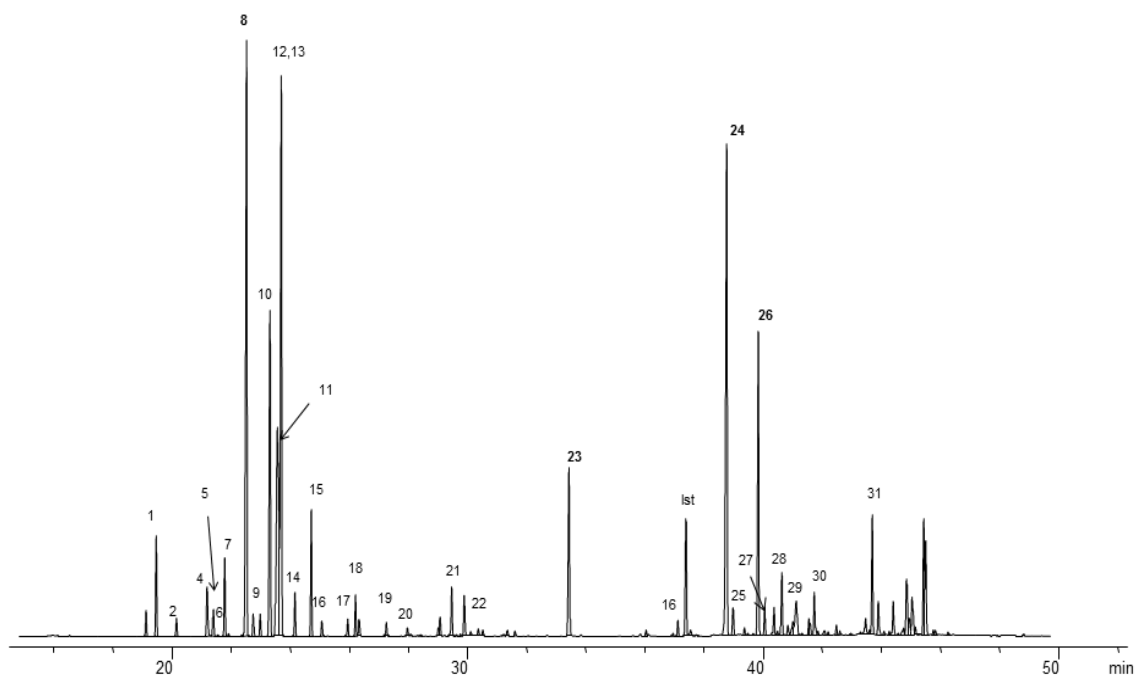


Tabla 4. Composición química del AE de *L. origanoides*, quimiotipo felandreno, obtenido por MWHD.

Nº Pico	LRI		Tipo	Cantidad relativa, % (\pm s, n=3)			Compuesto
	DB-5	DB-WAX					
1	930	1026	HM	1.93	\pm 0.06		α -Tujeno
2	937	1029	HM	0.50	\pm 0.21		α -Pineno
3	955	1070	HM	0.33	\pm 0.03		Canfeno
4	976	1126	HM	1.46	\pm 0.08		Sabineno
5	980	1451	HM	0.44	\pm 0.03		1-Octen-3-ol
6	982	1115	HM	0.46	\pm 0.04		β -Pineno

Continuación Tabla 4.

Nº Pico	LRI		Tipo	Cantidad relativa, % (± s, n=3)			Compuesto
	DB-5	DB-WAX					
7	991	1166	HM	2.20	±	0.11	β-Mirceno
8	1012	1173	HM	12.90	±	0.61	α-Felandreno
9	1021	1185	HM	2.90	±	0.04	α-Terpineno
10	1028	1278	HM	7.00	±	0.30	p-Cimeno
11	1035	1205	HM	7.20	±	0.30	Limoneno
12	1040	1217	HM	9.70	±	0.50	β-Felandreno
13	--	1220	MO	3.27	±	0.05	1,8-Cineol
14	1048	1255	HM	0.85	±	0.01	trans- β-Cimeno
15	1063	1253	HM	2.50	±	0.20	γ-Terpineno
16	1075	1555	MO	0.84	±	0.02	cis-Hidrato de sabineno
17	1090	1290	HM	0.71	±	0.02	Terpinoleno
18	1101	1550	MO	0.87	±	0.02	Linalol
19	1106	1473	MO	0.42	±	0.03	trans- Hidrato de sabineno
20	1181	1725	MO	0.76	±	0.04	Borneol
21	1187	1603	MO	1.00	±	0.05	Terpinen-4-ol
22	1235	1600	MO	0.22	±	0.02	Timol metil éter
23	1299	2191	MO	4.80	±	0.40	Timol
24	1438	1617	HS	12.67	±	0.09	trans-β-Cariofileno
25	1448	1597	HS	0.67	±	0.03	trans-α-Bergamoteno
26	1475	1689	HS	6.74	±	0.03	α-Humuleno
27	1495	1724	HS	1.20	±	0.01	Germacreno D
28	1510	1748	HS	2.40	±	0.50	Biclogermacreno
29	1518	1733	HS	0.64	±	0.03	β-Bisaboleno
30	1529	1768	HS	1.65	±	0.01	δ-Cadineno
31	1534	1847	HS	0.40	±	0.02	cis-Calameneno
32	1603	2003	HS	3.28	±	0.02	Óxido de cariofileno

HM: Hidrocarburo monoterpénico

MO: Monoterpeno oxigenado

HS: Hidrocarburo sesquiterpénico

4.2.2 Identificación de flavonoides aislados por extracción con solvente.

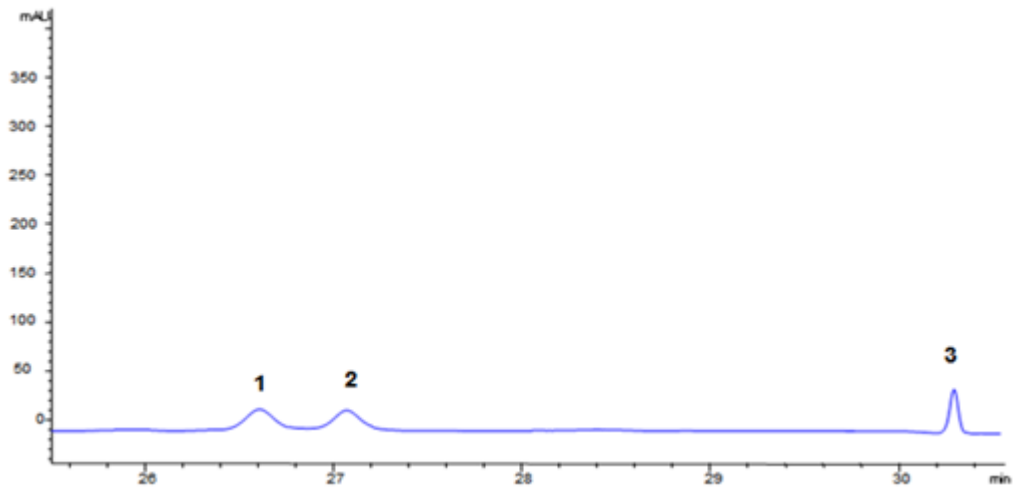
Aplicando las metodologías desarrolladas para la obtención y análisis de los extractos mediante HPLC [102] (**Secciones 3.3 y 3.4.3**), se identificaron los compuestos fenólicos presentes en la planta de *L. origanoides*, quimiotipos carvacrol, timol y felandreno.

Con respecto a la mezcla de sustancias de referencia certificadas de 24 analitos, se logró identificar luteolina en el extracto del quimiotipo carvacrol. Mientras que en el extracto del quimiotipo timol se detectaron luteolina, quercetina y naringenina. Para el extracto del quimiotipo felandreno únicamente se identificó la pinocembrina.

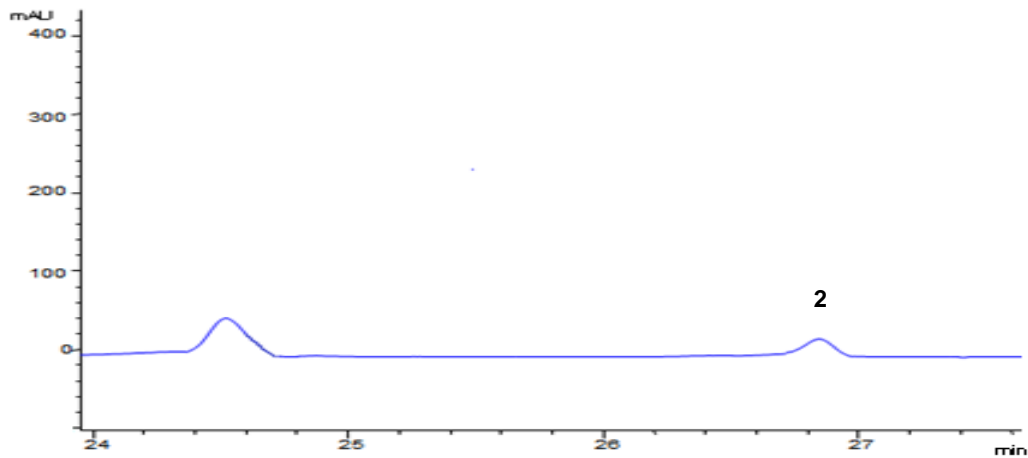
Cala [102] identificó en los extractos con solvente, de los tres quimiotipos de *L. origanoides*, naringenina, luteolina y pinocembrina. *L. origanoides*, quimiotipos carvacrol y timol, presentaron contenido más alto de naringenina (1,3–1,8 mg/g de planta), seguido de luteolina (0,14–0,20 mg/g de planta) y pinocembrina (0,038–0,047 mg/g de planta). Por el contrario, *L. origanoides*, quimiotipo felandreno, presentó contenido alto de pinocembrina (7,3 mg/g de planta), seguido de naringenina (0,27 mg/g de planta) y luteolina (0,14 mg/g de planta). Además, Stashenko *et al.* [103] y Ruiz [104] identificaron pinocembrina (3,65 %) como compuesto mayoritario en los extractos aislados con fluido supercrítico. En la **Figura 26**, se observan los perfiles cromatográficos de cada uno de los extractos bajo estudio.

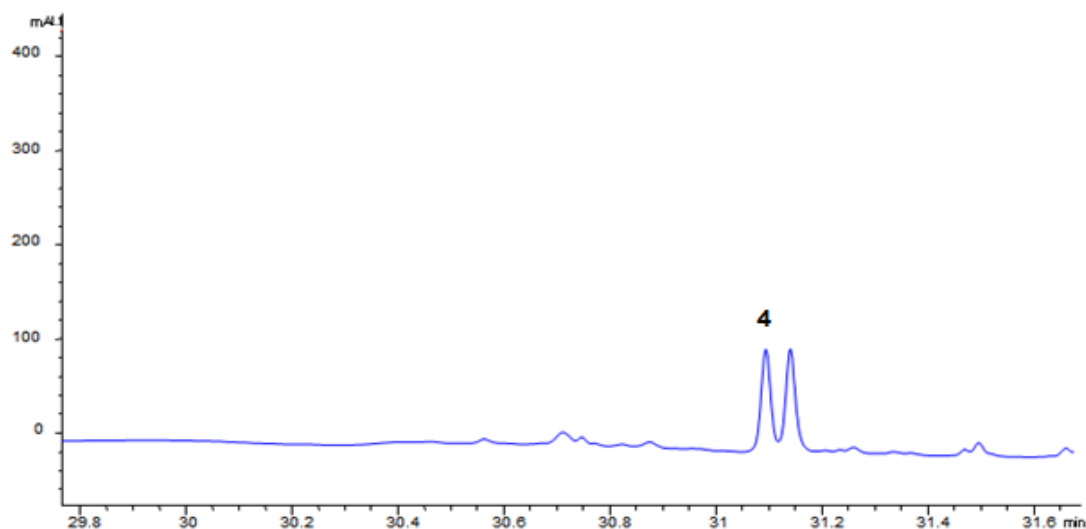
Figura 26. Perfil cromatográfico de extractos SE de la especie *Lippia origanoides*: **A.** Quimiotipo timol; **B.** Quimiotipo carvacrol y **C.** Quimiotipo felandreno; obtenidos por HPLC-DAD-UV-Vis en la columna apolar Kinetex C18 (4.6 mm × 100 mm, 2.5 µm); **1-** Quercetina, **2-** Luteolina, **3-** Naringenina, **4-** Pinocembrina.

A



B





4.3 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS

4.3.1 Comparación de la capacidad antirradicalaria de los AE y extractos de *L. origanoides*, quimiotipos timol, carvacrol y felandreno. La capacidad antirradicalaria, determinada por los métodos ORAC y TEAC, se midió para los AE y extractos SE de la especie *L. origanoides*, quimiotipos timol, carvacrol y felandreno. Así mismo, de sustancias de referencia, tales como α -tocoferol y BHT, los que se usan ampliamente en plásticos, gomas, polímeros y alimentos [105]. Además, se realizaron las mediciones por los dos métodos implementados de dos fenoles y cuatro flavonoides, componentes mayoritarios de los AE y extractos, respectivamente.

Todo esto, con el fin de establecer si los AE y extractos analizados tuvieron capacidades antirradicalarias mayores, menores o comparables con las de algunas sustancias de referencia.

Tabla 5. Capacidad de atrapar radicales medida por el método de decoloración del **ABTS⁺**

Muestras evaluadas	Métodos de medición	
	ABTS ⁺	ORAC
	μmol Trolox [®] /g muestra*	
BHT	4560 ± 29	480 ± 9
α-Tocoferol	2080 ± 12	550 ± 18
Timol	6000 ± 130	2800 ± 126
Carvacrol	4700 ± 117	3680 ± 21
Luteolina	186.8 ± 0.4	2410 ± 77
Pinocembrina	99 ± 5	1540 ± 71
Naringenina	164 ± 4	2300 ± 150
Quercetina	600 ± 7	6100 ± 20
AE, quimiotipo felandreno	340 ± 15	1340 ± 33
AE, quimiotipo carvacrol	5200 ± 260	2800 ± 230
AE, quimiotipo timol	5100 ± 140	2680 ± 33
Extracto, quimiotipo felandreno ¹	350 ± 23	8020 ± 4
Extracto, quimiotipo carvacrol ²	170 ± 21	3720 ± 290
Extracto, quimiotipo timol ³	170 ± 53	3810 ± 80

Valor promedio ± desviación estándar (n=3). Flavonoides identificados:

¹Pinocembrina; ² Luteolina; ³ Luteolina, quercetina, naringenina.

En la **Tabla 5**, se reportan los valores de TAC (*Total Antioxidant Capacity*) para los compuestos antioxidantes analizados, expresados como μmol de Trolox[®]/g de antioxidante.

4.3.1.1 TEAC o ensayo de decoloración del catión-radical ABTS^{•+}. Se evaluó la capacidad de atrapar radicales *in vitro* de la mezcla de componentes de origen natural. Con respecto a los extractos, la planta rica, en felandreno, exhibió mayor capacidad antirradicalaria, aunque no superó a las sustancias de referencia evaluadas. Para los AE, ricos en timol y carvacrol, los valores de dicha actividad secuestradora de radicales, fueron mayores comparados con los antioxidantes comerciales, los extractos y con el patrón certificado de carvacrol ($4700 \pm 117 \mu\text{mol}$ de Trolox[®]/g de antioxidante); sin embargo, mostró mayor actividad el patrón de timol ($6000 \pm 130 \mu\text{mol}$ de Trolox[®]/g de antioxidante), que los propios AE que lo contenían. Entre los AE, fue más activo, según este método, el AE, quimiotipo carvacrol ($5200 \pm 260 \mu\text{mol}$ de Trolox[®]/g de antioxidante), que presentó un valor mayor con respecto al estudio de Muñoz *et al.* [106] quienes reportaron para el AE de *Lippia origanoides*, rico en carvacrol, un valor de $2040 \pm 21 \mu\text{mol}$ de Trolox[®]/g de antioxidante.

La capacidad antioxidante de los AE se atribuye a los compuestos activos presentes en ellos, es decir, que se debe tanto a los componentes principales como a la presencia de aquellos constituyentes en pequeñas cantidades, o la sinergia entre ellos.

Según la determinación realizada por GC-MS, el contenido de compuestos fenólicos de los AE aislados, quimiotipos carvacrol y timol, fue alto, 68.37 y 78.73%, respectivamente. Entre ellos, el timol y el carvacrol fueron los compuestos fenólicos, que se encontraron en mayor proporción.

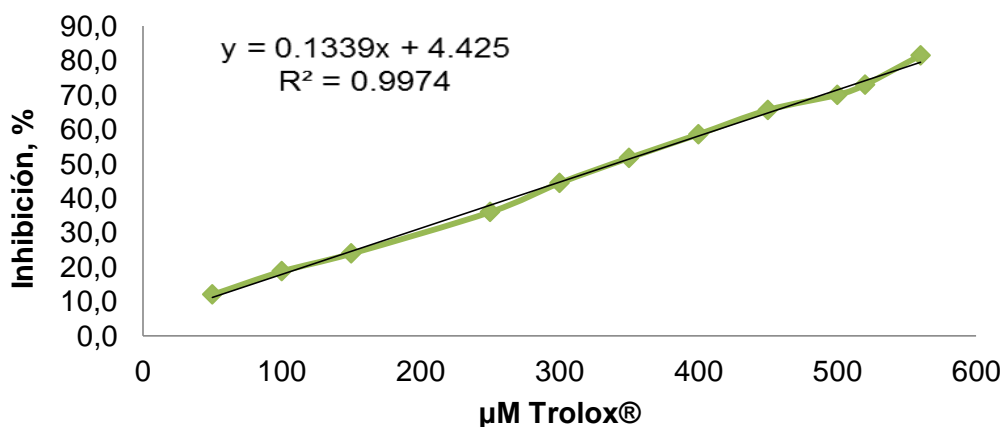
La capacidad antioxidante, que presentaron los AE, depende de sus componentes fenólicos. Esto no solo se debe a las características estructurales que poseen los compuestos fenólicos, sino también a otros factores como la concentración, la temperatura, la luz, el tipo de sustrato y el estado físico del sistema, así como la forma en la que actúan sus componentes (prooxidantes o sinérgicos) [107].

Los valores de capacidad antioxidante obtenidos mediante el método TEAC confirmaron que los AE, de los quimiotipos timol y carvacrol, poseen mejor capacidad antioxidante, que el AE del quimiotipo felandreno (Véase **Tabla 5**), este efecto se debe a la presencia del timol y el carvacrol, pero también a un posible efecto sinérgico entre los compuestos que contienen oxígeno. Esto se demostró en un estudio realizado sobre la composición química y capacidad antioxidante del AE del orégano (*Origanum vulgare*), que crece en Croacia [62]. Todo esto, porque el orégano (*Origanum vulgare*) tiene en común con *L. origanoides* algunos compuestos, como el timol y el carvacrol. En otros estudios, se evaluó cómo puede afectar la capacidad de secuestrar radicales el comportamiento cinético de algunos compuestos [107]; a los componentes lentos en reaccionar, su influencia sobre la capacidad antirradicalaria se le atribuyó a la complejidad del mecanismo de reacción.

El AE, del quimiotipo felandreno, presentó menor capacidad antioxidante para ambos métodos; esto pudo ser porque sus constituyentes están involucrados en una o más reacciones secundarias que dieron como resultado la lenta reducción del catión-radical ABTS⁺ y del radical AAPH, o que sus componentes presentan una acción anti- o prooxidante [107-108].

En la **Figura 27**, se observa el porcentaje de inhibición de la absorbancia exhibida por el catión-radical $ABTS^+$, en presencia del antioxidante Trolox[®]. El catión-radical residual se cuantificó espectrofotométricamente en un periodo de tiempo dado (30 min) donde la disminución en la concentración es función del tiempo, y se produce por la oxidación del Trolox[®] a una concentración dada (50-550 μM). La decoloración del catión-radical $ABTS^+$ se calculó respecto a la reactividad del Trolox[®], lo que permitió obtener la curva de calibración para este ensayo.

Figura 27. Curva de calibración del Trolox[®] por el ensayo de decoloración del catión-radical $ABTS^+$.



4.3.1.2 Capacidad de absorción del oxígeno radical. El ensayo midió la degradación oxidativa de la fluoresceína, en presencia de un compuesto antioxidante, después de haber sido mezclado con el generador de radicales AAPH.

La capacidad antirradicalaria entre los AE fue mayor en los quimiotipos carvacrol y timol. Sin embargo, los extractos de *L. origanoides*, de los tres quimiotipos presentaron mayor capacidad para atrapar los radicales AAPH, comparada con los AE, los antioxidantes comerciales y los patrones certificados. Entre ellos, fue más activo, según este método, el extracto de *L. origanoides*, quimiotipo felandreno, ($8020 \pm 4 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ muestra); se le puede atribuir su efecto antioxidante a su alto contenido de pinocembrina.

Al comparar los resultados con el trabajo de Jiménez *et al.* [109], quienes evaluaron la capacidad antioxidante del extracto (SE) del orégano liofilizado (Lausanne, Suiza) por este ensayo, se encontró que los extractos y los AE de la planta bajo estudio en el presente trabajo, exhibieron mayor capacidad antirradicalaria que el extracto de orégano de Lausanne, Suiza ($1168 \pm 105 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ muestra).

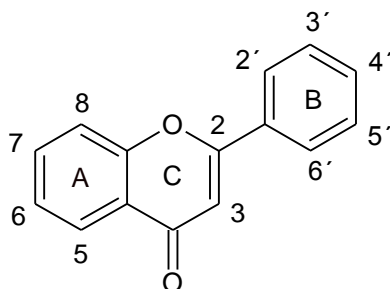
Los resultados reportados en la **Tabla 5**, demuestran que la alta capacidad de los extractos para “secuestrar” radicales, se debe al contenido de compuestos fenólicos presentes (determinados por HPLC-DAD), dentro de los cuales se encuentran la pinocembrina, luteolina, naringenina y quercetina. Estos compuestos no se extraen por destilación, pero sí con solvente (metanol-agua), por ser compuestos mucho más polares y menos volátiles.

Varios flavonoides han sido reportados como “extinguidores-secuestradores” de especies activas de oxígeno; además inhiben *in vitro* la oxidación de lipoproteínas de baja densidad [110-113]. Algunos de ellos, se caracterizan por compartir un esqueleto similar con un número y posición variable de los grupos hidroxilo (Véase

Figura 28); este es el caso de los cuatro flavonoides identificados mediante HPLC-DAD en los extractos de la planta estudiada.

La capacidad antioxidante de la luteolina, naringenina, pinocembrina y quercetina, presentes en los extractos metanólicos de los tres quimiotipos de *L. origanoides*, se relaciona con el número y la posición de los grupos hidroxilo presentes en los anillos aromáticos de sus respectivas estructuras (Véase **Figura 29**) [114].

Figura 28. Esqueleto compartido por los cuatro flavonoides encontrados en los extractos de los tres quimiotipos de *L. origanoides*.

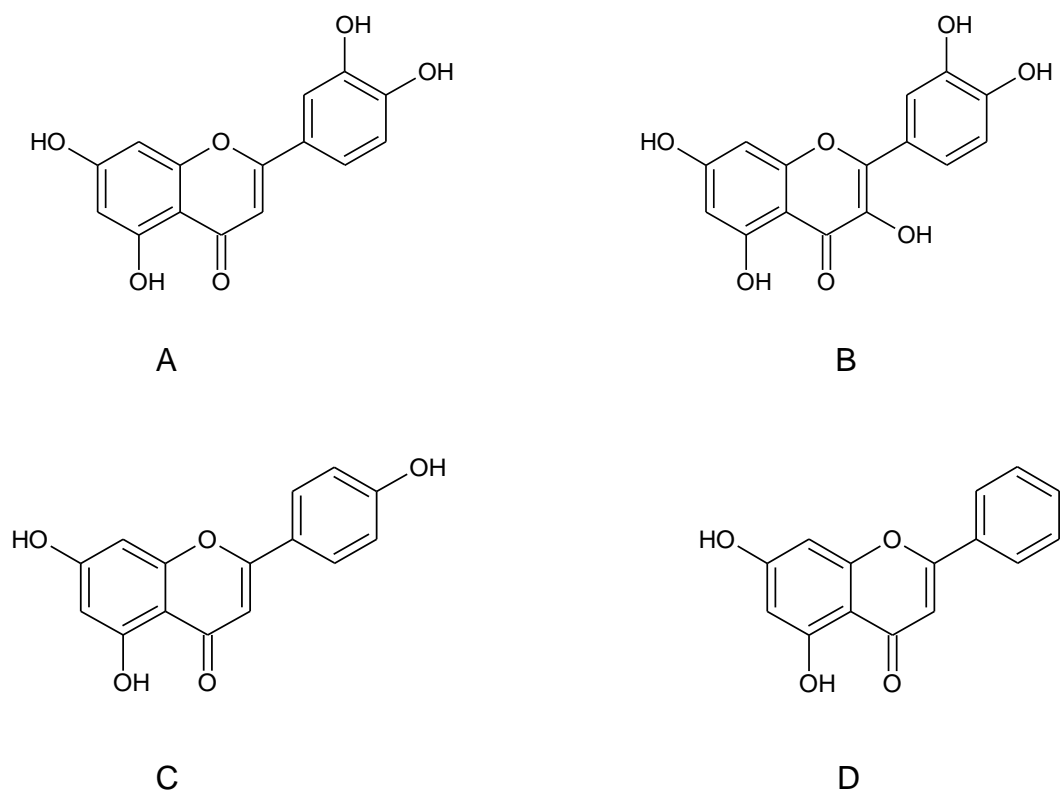


Con base en las estructuras de los flavonoides (**Figura 29**), la quercetina tiene el mayor número de grupos hidroxilo. Las posiciones 3 del anillo C y 4' del anillo B, las ocupan dos de los grupos $-OH$, que estabilizan el radical fenoxilo formado y que atrapan eficientemente radicales peroxilo, lo cual contribuye a un mayor efecto antioxidante. Para el caso de la luteolina, la naringenina y la pinocembrina, que no contienen el grupo OH en la posición 3 del anillo C, su capacidad antioxidante se disminuye comparada con la quercetina.

Así mismo, se puede suponer, que la capacidad antirradicalaria de la luteolina se debe a la estructura *orto*-dihidroxi del anillo B, lo cual la hace mejor “antioxidante”, que la de la naringenina y la pinocembrina. Para el caso de la naringenina, su capacidad antioxidante se puede atribuir a la presencia del grupo hidroxilo, en la

posición 4' del anillo B, que le confiere estabilidad al radical formado. La pinocembrina presenta una baja capacidad antioxidante comparada con los otros flavonoides estudiados. Se puede suponer, que la falta de grupos OH en el anillo B es lo que no le confiere una alta estabilidad al radical formado.

Figura 29. Estructura de los cuatro flavonoides identificados en los extractos con solvente. A. Luteolina; B. Quercetina; C. Naringenina y D. Pinocembrina.



La razón por la cual las posiciones juegan un papel importante en la capacidad antioxidante de estos flavonoides es que los grupos hidroxilo, en algunas posiciones, se vuelven más vulnerables, con respecto a otras, a la pérdida de un protón. Esto explica por qué las posiciones 3, 3', 4' y 3', 4', ocupadas por los grupos hidroxilo, en la quercetina y la luteolina, respectivamente, las hacen más

efectivas como antioxidantes [111]. Esto se ve reflejado en los valores medidos por los métodos ORAC y TEAC de capacidad antioxidante de los tres flavonoides. (Ver **Tabla 5**). Sin embargo, el mayor efecto antioxidante se exhibió en el extracto del quimiotipo felandreno, rico en pinocembrina. Aunque la pinocembrina no presenta la mayor capacidad “secuestradora” de radicales con respecto a los demás flavonoides identificados en los diferentes extractos, pudo deberse a su alto contenido en el extracto o, también, a la presencia de otros compuestos antioxidantes, que no se identificaron.

Trouillas *et al.* [114] estimaron la entalpía de disociación de enlace para la quercetina, estructura molecular presentada en la **Figura 29 B**, que contiene grupos hidroxilo en las posiciones 5 y 7 en el anillo A (sustituciones, que están presentes en los demás flavonoides estudiados); 3, en el anillo C, y 3' y 4', en el anillo B (al igual que la luteolina). En dicho estudio, determinaron la secuencia energética creciente favorable para la transferencia de átomos de hidrógeno de los grupos -OH de la quercetina, correspondiente a: 4'-OH < 3'-OH < 3-OH < 7-OH < 5-OH. Considerando los resultados obtenidos para la capacidad antioxidante de la quercetina, con los demás flavonoides utilizados evaluados, se puede suponer, en términos de su estructura, que la presencia del grupo hidroxilo en la posición 3 en el anillo C, junto con sustituciones de hidroxilo en el anillo B, incrementan notablemente la capacidad antioxidante, debido a que son los más favorecidos energéticamente para reaccionar atrapando radicales libres, y más aún si existe el

grupo catecol en dicho anillo, en conjunto con el doble enlace 2,3- conjugado con el 4-oxo en el anillo C; así mismo, los grupos hidroxilo en las posiciones 5 y 7 del anillo A, son menos “importantes” debido a que se encuentran menos favorecidos energéticamente para la transferencia de protones requerida para atrapar radicales libres [115].

En general, se observó que los AE, extractos y sus componentes mayoritarios presentaron mayor capacidad antirradicalaria que los antioxidantes de referencia, BHT y α -tocoferol. La capacidad antioxidante del BHT y del α -tocoferol, no depende del número, ni de las posiciones de los grupos hidroxilo, debido a que solo presentan un grupo hidroxilo en sus estructuras (Véase **Figura 4**), en comparación con los cuatro flavonoides, que sí presentan varios grupos hidroxilo. Sin embargo, la eficacia de un antioxidante, también, se determina por más factores, incluyendo su energía de activación, velocidad constante, el potencial de óxido-reducción, la estabilidad térmica del radical intermediario y la hidrofobicidad [116].

La capacidad antioxidante, que presenta el BHT, se debe a los dos grupos *tert*-butilo y al grupo metilo que lo hacen más hidrófobo y, por consiguiente, más soluble en disolventes orgánicos. Por otro lado, la capacidad antioxidante del α -tocoferol se basa en un sistema redox tocoferol-tocoferilquinona [117]. Esta vitamina se oxida fácilmente en el aire, sobretodo, en presencia de hierro y otros metales; cuando esto ocurre, el grupo hidroxilo del anillo cambia a un grupo oxi, el anillo se abre y se forma primero una quinona, la tocoferol-quinona, que no posee actividad biológica. Luego, esta especie puede reducirse a tocoferol hidroquinona, eliminando/secuestrando los radicales libres, que contienen oxígeno [118-120].

Se ha sugerido que la larga cadena de fitilo (cadena de cuatro unidades de isopreno) permite al tocoferol repartirse entre las membranas lipófilas de células y orgánulos, donde ejercerían su acción antioxidante, evitando el daño oxidativo [117].

Aunque en el ensayo ORAC se demostró, que los valores de capacidad antioxidantes, de los patrones certificados de los flavonoides, en orden

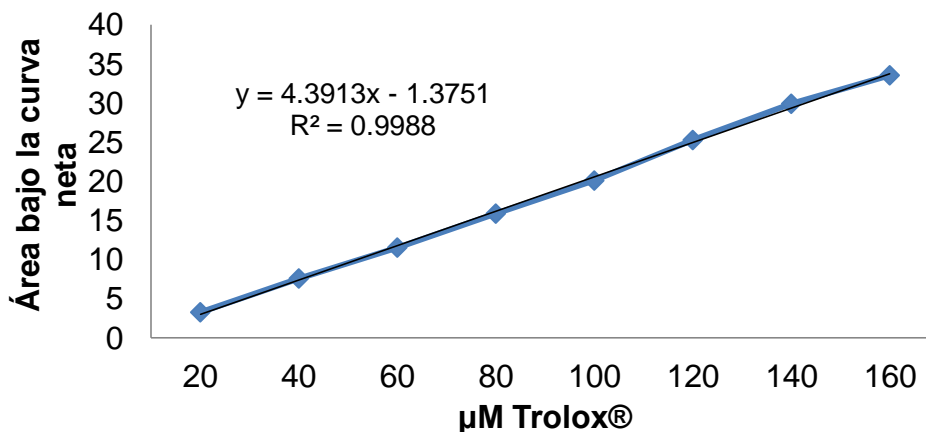
descendente fueron: quercetina > luteolina > naringenina > pinocembrina, el ensayo TEAC no pudo detectar la diferencia antirradicalaria entre la luteolina y la naringenina. Esto indicó, que el ensayo ORAC fue más sensible, que el método TEAC, en el análisis de la capacidad antioxidante de los flavonoides evaluados. Lo mismo sucedió con los antioxidantes sintéticos de referencia BHT y α -tocoferol, en el ensayo ORAC: la capacidad antioxidante del α -tocoferol (550 ± 18) fue superior a la del BHT (480 ± 9), mientras que en el ensayo TEAC el BHT (4560 ± 29) fue mejor antioxidante que el α -tocoferol (2080 ± 12).

Por lo anterior, se podría concluir, que el método ORAC fue más adecuado que TEAC, para determinar las propiedades antioxidantes de los extractos (SE) de *L. origanoides*. De esta manera, podría suponerse que los extractos, ricos en flavonoides (quercetina, luteolina, naringenina y pinocembrina), pueden presentar un mayor efecto antirradicalario mediante la transferencia de átomos de hidrógeno (por ruptura directa del enlace O-H), para formar el radical fenoxilo y estabilizar radicales peroxilo, típicos del ensayo ORAC.

La **Figura 30**, muestra la actividad antioxidante del Trolox[®] medida con la inhibición de los radicales peroxilo y la disminución en la velocidad de la fluorescencia de la FL por la presencia de un antioxidante (Trolox[®]).

Se puede concluir, que la capacidad antioxidante depende del método, de la concentración y de la naturaleza de las propiedades fisicoquímicas de los antioxidantes estudiados [56]. Este hecho se observa claramente en la **Tabla 5**, en la cual los valores de la capacidad antioxidante evaluados por el método ORAC y TEAC, difieren significativamente. En estudios análogos se confirmó, que las mismas muestras antioxidantes exhibieron diferentes valores antioxidantes, según la concentración y los parámetros medidos [121,122].

Figura 30. Curva de calibración del Trolox® obtenida por el método de ORAC.



4.3.2 Análisis del contenido de ácidos grasos en el aceite de seje. La determinación de los FA se llevó a cabo a través de una extracción con solvente, seguida de su derivatización (Véase **Sección 3.4.4**). En el **Anexo A**, se presenta el perfil cromatográfico obtenido para el aceite de seje. En la **Tabla 6**, se muestran las cantidades relativas (%) de los FA presentes en el aceite de seje. El ácido láurico (C12: 0; 34.4 %) fue el mayoritario entre los ácidos grasos presentes. Sin embargo, también se evidencia la presencia del ácido graso de interés, ácido linoléico (C18: 3n3; 5.2%)

Tabla 6. Cantidad relativa (%) de los ácidos grasos presentes en el aceite de seje (Véase **Anexo 1**).

N° Pico	Ácido	Cantidad relativa, %
1	Ácido Caproico	0.31
2	Ácido Caprílico	4.71
3	Ácido Cáprico	3.97

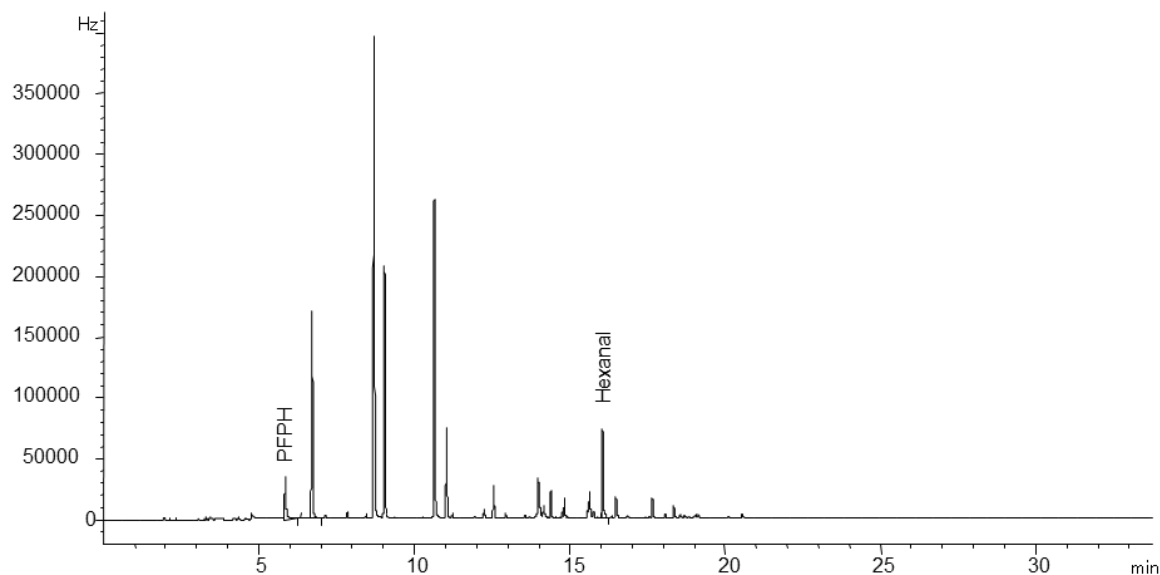
Continuación **Tabla 6.**

N° Pico	Ácido	Cantidad relativa, %
4	Ácido Láurico	34.4
5	Ácido Mirístico	14.2
6	Ácido Palmítico	8.43
7	Ácido Estearico	2.82
8	Ácido Oléico	9.91
9	Ácido Linoléico	5.16
10	Ácido Linolénico	12.6

4.3.3 Evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro* de los AE y extractos en un sistema lipídico. En esta etapa, se evaluó la capacidad antiradicalaria de antioxidantes sintéticos y naturales en un sistema lipídico sometido a la radiación UVA, tal como se describe en el **Numeral 3.5.2.**

El perfil cromatográfico de los derivados hidrazónicos de los compuestos carbonílicos, producto de la descomposición de los ácidos durante la peroxidación lipídica, inducida durante 12 horas en el aceite de seje. Los aldehídos reaccionaron con el agente derivatizante (PFPH), con posterior extracción por HS-SPME. En la **Figura 31**, se observa su perfil cromatográfico.

Figura 31. Perfil cromatográfico típico de derivados carbonílicos generados en el aceite de seje, sometido a la radiación UVA.



La presencia del ácido linoléico en el aceite de seje se relaciona con la concentración del hexanal generado durante la degradación oxidativa de este ácido graso. En el cromatograma (**Figura 31**), se puede observar la formación de aldehídos, no sólo hexanal, ya que se obtienen aldehídos derivados de la peroxidación de los ácidos grasos que hacen parte de la composición del aceite de seje (Véase **Tabla 6**) y que se generan en diferentes cantidades.

Al someter el aceite de seje, en presencia de los AE y extractos, a la radiación UVA, utilizando la metodología descrita en la **Sección 3.5.2**, se observó que todas las muestras presentaron, en menor o mayor grado, un efecto protector, actuando

como secuestradores de los radicales libres y generando especies estables que protegieron la consecuente degradación de la matriz.

En la **Tabla 7**, se observa el grado de protección de los AE, extractos y sustancias de control, además, la concentración de hexanal generado durante el proceso de oxidación de la muestra de aceite de seje. La curva de calibración del hexanal se realizó en un intervalo de concentraciones de 0.1 hasta 10 ppm (Véase **Anexo 2**). Con base en los resultados, se determinó la concentración de hexanal formado en cada una de las muestras.

Los resultados obtenidos muestran, que el empleo del extracto de la especie *L. origanoides*, quimiotipo felandreno (73%), presentó el mayor grado de protección con respecto a los demás AE, extractos y sustancias control (BHT y α -tocoferol). También, se evaluó el efecto protector en las mezclas de los AE y los extractos. Entre dichas muestras evaluadas, la mezcla de los AE, de los quimiotipos timol y carvacrol, presentó un 72% de protección frente a la peroxidación, valor similar al obtenido para el extracto, quimiotipo felandreno, y mayor para los valores obtenidos de las sustancias control, α -tocoferol (60%) y BHT (66%). Esto permite deducir, que el extracto del quimiotipo felandreno y la mezcla de los AE de los quimiotipos timol y carvacrol son buenos antioxidantes en el sistema lipídico evaluado. Esta actividad antioxidante alta, puede atribuírsele a la presencia de compuestos monooxigenados como el timol y el carvacrol, que son componentes mayoritarios en los AE, y moléculas de tipo flavonoide (pinocembrina), para el extracto, quimiotipo felandreno.

El sinergismo de los compuestos antioxidantes, o el número de grupos hidroxilo presente en los flavonoides, pudo ser la razón del aumento en la eficacia antirradicalaria, que superó a los antioxidantes comerciales.

Los flavonoides retiran oxígeno reactivo, especialmente, en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilo, hidroperóxidos y peróxidos lipídicos, bloqueando la oxidación de estas sustancias sobre las células [123]. Además, pueden ofrecer una alternativa para la protección de lípidos de la oxidación. Algunos de estos flavonoides han demostrado, en estudios previos, la inhibición de la oxidación lipídica en alimentos como la carne [124,125], el aceite de pescado [123,126] y la manteca de cerdo [127]. Por ejemplo, se ha venido estudiando efectos inhibidores de la quercetina en la oxidación del ácido linoléico [128], el colesterol [129] y en emulsiones. La donación de los grupos hidroxilo, presentes en el flavonoide, de un hidrógeno y un electrón a diversos radicales hidroxilo, peroxilo, superóxido y peroxinitrito, conduce a la pérdida de la reactividad como consecuencia de la estabilización del radical; se forma, además, un radical flavonoide, relativamente estable [130]. Esta donación se basa en el potencial de reducción del flavonoide, que depende de su estructura molecular [131].

En estudios realizados sobre la capacidad antioxidante de cinco flavonoides, en el aceite de canola, en una emulsión y en membranas de células de ratas, se observó, que la quercetina presentó mayor protección contra la oxidación del aceite de canola, seguido por la mircetina [116]. Resultados similares se obtuvieron en otro estudio, en el cual se evaluaron los efectos inhibidores de la quercetina y la morina sobre la oxidación del aceite de pescado [125]. Sin embargo, en el presente estudio, el extracto del quimiotipo timol, que contenía los flavonoides de mayor capacidad antioxidante, entre ellos, la quercetina, reflejó un menor grado de protección en la matriz lipídica. De lo anterior, podría deducirse que los flavonoides presentes, no identificados e identificados por HPLC-DAD, presentan un efecto contrario al sinérgico, disminuyendo su efecto protector sobre el aceite de seje.

Entre los antioxidantes sintéticos de referencia, al igual que en los estudios realizados por Chen [116], el BHT presentó un mayor porcentaje de protección con respecto al α -tocoferol y los extractos, debido a que este antioxidante es más hidrofóbico y más soluble en el aceite de seje; además, pudo ser más estable a las altas temperaturas (40 °C), a las cuales fue sometido.

Una estructura catecol en 3',4' del anillo B favorece enormemente la inhibición de la peroxidación lipídica, como debería ser en la quercetina y luteolina, con una capacidad para eliminar radicales peroxilo. Cuando el grupo catecol está presente, la oxidación de los flavonoides se produce en el anillo B, se obtiene un radical *orto*-semiquinona bastante estable, que facilita la deslocalización electrónica. La influencia de la disposición de otros grupos hidroxilo en la actividad antioxidante del flavonoide es menos destacada, sobre todo, por lo que respecta al anillo A [130]. Sin embargo, la pinocembrina no presenta el grupo catecol, y fue el extracto de felandreno (rico en pinocembrina), que presentó el mayor porcentaje de inhibición de la peroxidación lipídica. La alta concentración de este flavonoide, con respecto a los demás presentes, en los diferentes extractos, pudo ser el que potencializó el efecto antioxidante, además, de la presencia de otros compuestos polifenólicos no identificados.

Los porcentajes de protección de los AE individuales, no superaron a los dos antioxidantes sintéticos, pero sí lo hicieron las mezclas de los AE de los quimiotipos timol y carvacrol (72%) y timol y felandreno (69%). Mientras que la mezcla de los extractos de los quimiotipos carvacrol y felandreno arrojó un efecto protector mayor (63%), que el del α -tocoferol (60%), pero menor que el del BHT (66%) (Véase **Figura 32**).

En estudios realizados por Salgar [132], el autor muestra que el AE de *L. origanoides*, rico en timol, presentó diferente efecto protector según el sistema lipídico modelo evaluado. En el aceite de girasol a 220 °C, el AE (22%) mostró un efecto protector menor, que el BHT (65%) y el α -tocoferol (44%). Sin embargo, para un sistema lipídico modelo del ácido linoléico, en medio acuoso, inducido por la oxidación de FeSO₄, el AE (78%) exhibió un efecto protector mayor o igual, que el BHT (79%) y α -tocoferol (55%). En cuanto al presente trabajo, el efecto protector del AE del quimiotipo timol en el aceite de seje, sometido a la oxidación acelerada por la radiación UVA, presentó un valor de 51%.

Rojas y Santamaría [133], evaluaron el efecto protector del AE, rico en timol (31.9%) y carvacrol (32.4%). La matriz lipídica fue el aceite de girasol, que fue irradiado durante 12 horas con luz UVA. Los resultados mostraron un efecto protector del aceite sobre la matriz en un 33%. Sin embargo, el efecto protector del extracto SFE, rico en carvacrol (60%), presentó, sobre la misma matriz lipídica, un efecto protector de solo 50%.

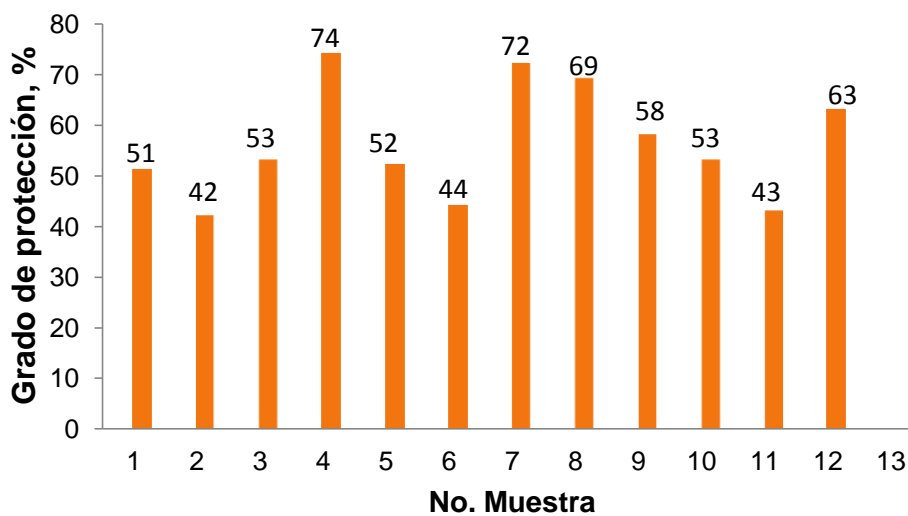
En términos generales, todas las muestras individuales o mezclas a estudiar, presentaron una disminución del hexanal, aldehído monitoreado durante la oxidación inducida por la luz UVA, en el sistema lipídico estudiado.

En el **Anexo C**, se observan los perfiles cromatográficos obtenidos, donde se muestra el hexanal generado por la oxidación del aceite de seje irradiado con luz UVA, de los AE, extractos y sustancias control bajo estudio.

Las investigaciones realizadas ponen en evidencia, que en los estudios de la actividad secuestradora de radicales libres, y en la inhibición de la peroxidación

lipídica de los compuestos fenólicos presentes en los AE y extractos de la especie *L. origanoides*, influyen los siguientes factores: los aspectos estructurales; las condiciones del ensayo; la concentración efectiva, que se alcance en el sitio donde se forma la ERO; la estabilidad del radical del antioxidante formado al donar un átomo de hidrógeno al radical atacante; la lipofilidad o hidrofiliidad, el pH del medio y la naturaleza del radical [134].

Figura 32. Evaluación del efecto protector de los AE y extractos bajo estudio, contra la peroxidación lipídica del aceite de seje, acelerada por la radiación UVA (Véase **Tabla 7**).



El uso de diferentes métodos para evaluar la capacidad antioxidante, es necesario. Un estudio donde se aplicaron varios métodos para evaluar la capacidad antirradicalaria mostró, que ningún método solo es suficiente para evaluar la capacidad antioxidante de una muestra. La combinación de los tres métodos fue una buena elección para estudiar la capacidad antioxidante del AE de orégano y esto fue la recomendación en las investigaciones similares [121,122].

Tabla 7. Porcentaje de protección de los AE, extractos, mezclas de aceites, mezclas de extractos, BHT y α -tocoferol en el aceite de seje.

No. Muestra	Grado de protección, % ($\pm s$, n=3)	Concentración del hexanal, ppm
BHT	66 \pm 3	0.210 \pm 0.006
α -Tocoferol	60 \pm 3	0.320 \pm 0.008
1 AE, quimiotipo timol	51 \pm 3	0.46 \pm 0.01
2 AE, quimiotipo carvacrol	53 \pm 1	0.43 \pm 0.01
3 AE, quimiotipo felandreno	42 \pm 3	0.623 \pm 0.007
4 Extracto, quimiotipo timol	44 \pm 4	0.526 \pm 0.003
5 Extracto, quimiotipo carvacrol	52 \pm 2	0.443 \pm 0.007
6 Extracto, quimiotipo felandreno	73 \pm 2	0.10 \pm 0.01
Mezclas:		
7 MAECT	72 \pm 2	0.121 \pm 0.009
8 MAETF	69 \pm 0.2	0.17 \pm 0.01
9 MAECF	58 \pm 3	0.35 \pm 0.01
10 MECT	53 \pm 4	0.422 \pm 0.009
11 METF	43 \pm 2	0.601 \pm 0.005
12 MECF	63 \pm 2	0.261 \pm 0.004

MAECT: Mezcla de los AE de los quimiotipos carvacrol y timol (1:1).

MAETF: Mezcla de los AE de los quimiotipos timol y felandreno (1:1).

MAECF: Mezcla de los AE de los quimiotipos carvacrol y felandreno (1:1).

MECT: Mezcla de los extractos (SE) de los quimiotipos carvacrol y timol (1:1).

METF: Mezcla de los extractos (SE) de los quimiotipos timol y felandreno (1:1).

MECF: Mezcla de los extractos (SE) de los quimiotipos carvacrol y felandreno (1:1).

CONCLUSIONES

- 1** Los metabolitos secundarios se aislaron de las plantas *L. origanoides*, quimiotipos timol, carvacrol y felandreno, mediante dos técnicas diferentes de extracción; MWHD y extracción con solvente. Se obtuvieron componentes mayoritarios, el timol y el carvacrol, en los AE, y en los extractos, se detectaron cuatro flavonoides, quercetina, luteolina, naringenina y pinocembrina, a los cuales se les atribuye, principalmente, la capacidad antioxidante de los extractos estudiados.
- 2** Se pudo concluir, que las diferencias entre los métodos de determinación de la actividad antioxidante utilizados, se deben a los mecanismos de reacción de cada ensayo, a la naturaleza del radical, al medio de reacción y a las cantidades de muestra de antioxidantes, que se evaluaron. De acuerdo con los análisis realizados a los patrones de referencia, a los AE y extractos, se pudo observar, que el método ORAC tiene mayor sensibilidad, que el método TEAC, lo que produjo que este último no estableciera diferencias, por ejemplo, entre los valores de capacidad antioxidante de los flavonoides luteolina y naringenina, y entre los extractos de los quimiotipos carvacrol y timol.
- 3** Se evaluó la capacidad antirradicalaria de antioxidantes comerciales, AE y extractos SE de la especie *L. origanoides*, mediante el método ORAC. Se pudo observar que, tanto los AE como los extractos, presentaron mayor capacidad de atrapar radicales peroxilo frente a los antioxidantes comerciales, BHT y α -tocoferol. Se observó, que la presencia de los flavonoides en los extractos potencializó el efecto antirradicalario.

- 4 Se evaluó la capacidad antirradicalaria de antioxidantes comerciales, AE y extractos de la especie *L. origanoides*, mediante el ensayo TEAC. Los AE de los quimiotipos timol y carvacrol, presentaron mayor capacidad de atrapar el catión-radical ABTS⁺ frente a los antioxidantes comerciales, BHT y α -tocoferol. Estos resultados indican la estrecha relación entre la concentración de los compuestos fenólicos en los AE y su capacidad antioxidante.

- 5 Se evaluó el efecto protector de los aceites esenciales y extractos de la especie *L. origanoides*, quimiotipos carvacrol, timol y felandreno, y dos antioxidantes sintéticos (BHT y α -tocoferol) mediante el monitoreo del hexanal generado en el proceso de peroxidación lipídica del aceite de seje acelerada mediante la exposición a radiación UVA. El efecto protector sobre el aceite de seje fue mayor en el extracto del quimiotipo felandreno ($73 \pm 2\%$) y en la mezcla de los aceites esenciales, quimiotipo carvacrol y timol, en proporción (1:1) ($72 \pm 2\%$), con respecto a las sustancias control BHT ($66 \pm 3\%$) y α -tocoferol ($60 \pm 3\%$).

- 6 El extracto del quimiotipo felandreno presentó, la mayor capacidad de inhibir radicales piróxilo, y el mayor efecto protector frente a la peroxidación del aceite seje, el cual es altamente utilizado en la industria cosmética. Además, su capacidad antirradicalaria lo convierte en una alternativa, para ser utilizado como conservante antioxidante en formulaciones cosméticas.

RECOMENDACIONES

1. Mediante la medición del hexanal, como producto de descomposición del ácido linoléico presente en el aceite de seje, se recomienda evaluar el proceso oxidativo únicamente del ácido linoléico, para evaluar la capacidad antioxidante de las diferentes muestras estudiadas y determinar cuánto puede afectar la matriz portadora del ácido graso a dicha capacidad antirradicalaria.
2. Realizar otro tipo de ensayos de actividad antioxidante, tales como: la degradación oxidativa mediante iones Fe (II) y/o DPPH; y determinar el contenido de fenoles, mediante el método Folin-Ciocalteu. Lo anterior, permitiría comparar los resultados obtenidos en el presente trabajo utilizando los quimiotipos de la especie vegetal estudiada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt y FUNDACOFAN, **2002**. “Informe final: Estudio de mercado nacional de aceites esenciales”, Bogotá, pp. 18-21.
2. PROEXPORT COLOMBIA, Sector cosméticos, Editorial Fiducoldex, Bogotá D.C., **2010**, pp. 13-14. http://www.inviertaencolombia.com.co/images/stories/Cosmticos_Perfil_Sectorial_Febrero_2010.pdf. [Consulta: 1 de diciembre de 2011].
3. OCAMPO, R.; MARTÍNEZ, J. y CÁCERES, A. Manual de agrotecnología de plantas medicinales nativas, Ediciones Sanabria, Costa Rica, **2007**, pp. 88-92.
4. BROWN, J. T., HEGALY, P.K. y CHARLWOOD, B.V. Mono- and Sesquiterpene biosynthesis in plant cells in culture. Part 4. The toxicity of monoterpenes to plant cell cultures, *Plant Sci.*, **1987**, 48, pp. 195-201.
5. GUPTA, M. 270 Plantas medicinales iberoamericanas, Editorial Presencia, Santa Fé de Bogotá, **1995**, pp. 565-566.
6. STAPLES, G. y KRISTIANSEN, M. Ethnic culinary herbs, University of Hawaii Press, EE.UU, **1999**, pp. 59.

7. TRUJILLO, P. A.; RIOS, E. y CASTAÑO, C. Evaluación de la actividad antimicrobiana, antitumoral y citotóxica de los compuestos químicos de los aceites esenciales obtenidos de *Cymbopogon citratus*, *Lippia alba Mill* y *Lippia origanoides*, y el aceite extraído de la cáscara de la nuez de *Anacardium occidentale* cultivados en los departamentos de Quindío y Valle del Cauca. *Biomedica*, **2011**, 31, pp. 209-421.
8. ZAPATA, B.; DURÁN, C.; STASHENKO, E.; ROYERO, J. C. y GALVIS, L. Actividad citotóxica de aceites esenciales de *Lippia origanoides* H.B.K. y componentes mayoritarios. *Salud UIS*, **2009**, 49, pp. 215-222.
9. CERPA, M. Hidrodestilación de aceites esenciales, modelado y caracterización. Trabajo de posgrado, Universidad de Valladolid, Valladolid, España, **2007**, pp, 84-99.
10. BANDONI, A.; MENDIONDO, M.; RONDINA, R. y COUSSIO, J. Survey of Argentine medicinal plants. Folklore and Phytochemical Screening. *J. Nat. Prod.* **1972**, 35, pp. 69-81.
11. VERMERRIS, W. y NICHOLSON, R. Phenolic compound biochemistry; Springer, New York, EE.UU., **2008**, pp. 1-24.
12. BELITZ, H. D., GROSCH, W. y SCHIEBERLE, P. Food Chemistry: Springer, Berlin, **2009**, pp. 304.

13. BARBERÁN, F.; FERRERES, F.; ORTIZ, A. y FERNÁNDEZ, M. Estudio sobre el contenido en flavonoides de las mieles de la Alcarria: su aplicación a la caracterización geográfico-botánica; Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Castilla-La Mancha, España. **1994**. pp. 9-12.
14. ARIAS, M., Caracterización físico-química y sensorial de Nabiza y Grelo (*Brassica rapa* L.). Tesis de Doctorado. Universidad de Santiago de Compostela. **2009**, pp. 38-40.
15. STASHENKO, E.; CERVANTES, M.; COMBARIZA, M. y MARTINEZ J. HRGC/FID and HRGC/MSD Análisis of the secondary metabolites obtained by different extraction methods from *Lepechinia schiedeana* and *in vitro* evaluation of its antioxidant activity. *J. High Resol. Chromatogr.* **1999**, 22, pp. 343-349.
16. CAVERO, S.; GARCÍA-RISCO, M.R.; MARÍN, F.; JAIME, L.; SANTOYO, S.; SEÑORÁNS, F. J.; REGLERO, G. y IBÁÑEZ, E.; Supercritical fluid extraction of antioxidant compounds from oregano. Chemical and functional characterization via LC-MS and *in vitro* assays, *J. Supercrit. Fluids*, **2006**, 38, pp. 62-69.
17. FERHAT, M.; MEKLATI, B.; SMADJA, J. y CHEMAT, F. An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel, *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1112, pp. 121-126.
18. GÓMEZ, N. y WITTE, L. A simple method to extract essential oils from tissue samples by using microwave radiation. *J. Chem. Ecol.* **2001**, 27, pp. 2351-2359.

19. METAXAS, A. y MEREDITH, R. Industrial Microwave Heating, Peregrinus Ltd., London, **1993**, pp. 151-167.
20. GRECO, L. y BRUNO, M. Food Science and Technology; NOVA, New York, EE.UU, **2008**. pp. 18-19.
21. MITRA, S. Sample preparation techniques in analytical chemistry, John Wiley & Sons, Inc. New York, EE.UU., **2003**, pp. 140-141.
22. KARASEK, F. Basic gas chromatography-mass spectrometry. 1^a Ed. Amsterdam: *Elsevier*. **1988**, 201 p.
23. SATINDER, A. Chromatography and separation science, Academic Press, New York, EE.UU, **2003**, 4, pp. 1-9, 133-142.
24. JENNINGS, W.; MITTFELDT, e.; STREMPLE, P. Analytical gas chromatography. 2nd., Academic Press, London, UK, **1987**, pp. 1-287.
25. POOPLE, C.F. y POOPLE S, K.; Chromatography Today, Elsevier, Amsterdam, **1991**, 1026 p.
26. PINO, J. A.; ORTEGA, A. G.; PÉREZ, A.; RODRÍGUEZ. M.; BALUJA, R. Composición y propiedades del aceite esencial de *Lippia alba* (MII) N.E. Brown, *Rev. Cub. Farm.*, **1997**, 30, pp. 30.

- 27.** FAJARDO, O. Estudio comparativo de la composición química y evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial de *Aloysia tripilla* (L'Her) Britton, cultivada en tres regiones de Colombia. Trabajo de Grado. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia, **2007**, pp. 65-86.
- 28.** DELLACASSA, E. Normalización de productos naturales obtenidos de especies de la flora aromática latinoamericana. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil, **2010**, pp. 140-141.
- 29.** MERKEN, H.M. y BEECHER, G.R.; Measurement of food flavonoids by high performance liquid chromatography: a review, *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, pp. 577-5799.
- 30.** PERL, I.M. y FUZFAI, Z.; Chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrochromatographic techniques in the analysis of flavonoids, *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1073, pp. 201-207.
- 31.** VÉLEZ, M. y CUADRADO B., Control microbiológico de medicamentos, cosméticos y desinfectantes, Editorial Universitaria, Cartagena de Indias, **2005**, pp.49-56.
- 32.** Nutrition and cosmetics industries must clear up cosmeceutical confusion, **2009**. <http://www.cosmeticsdesign-europe.com/Market-Trends/Nutrition-and-cosmetics-industries-must-clear-up-cosmeceutical-confusion>. [Consulta: 26 de agosto de 2012].

- 33.** CBI. Natural ingredients for cosmetics the EU market for essential oils for cosmetics, EE.UU., **2009**. <http://www.cbi.eu/About%20CBI/CBI%20Services/Export%20Coaching%20Programme/Natural-Ingredients-for-Food-Pharmaceuticals-and-Cosmetics/2174&type=module>. [Consulta: 1 de diciembre de 2011].
- 34.** CONTRERAS, N. Evaluación de la actividad antioxidante *in-vitro* de algunos aceites esenciales en el proceso de peroxidación lipídica inducida por la radiación ultravioleta. Trabajo de Grado, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. **2002**, pp. 87-126.
- 35.** Ficha técnica del aceite de seje, Neyber Ltda. <http://neyberltda.com/productos/aceitesfijos/Seje.pdf>. [Consulta: 10 de junio de 2012].
- 36.** LINARES, J. *Oenocarpus bataua* Mart, **2007**, <http://www.siac.net.co/sib/catalogoespecies/especie.do?idBuscar=320&method=displayAAT>. [Consulta: 17 de julio de 2012].
- 37.** Aplicaciones del aceite de seje. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1745-4522.2009.01171.x/abstract>. [Consulta: 18 de julio de 2012].
- 38.** UGARTONDO, V. Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. Tesis de Doctorado, Universidad de Barcelona, Barcelona, España. **2009**, pp. 120-142.

- 39.** MCCLEMENTS, D. J. y DECKER, E. A. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *Concise Reviews in Food Science*, **2000**, 65, pp. 1270-1282.
- 40.** TAFURT, G. G. Estudio teórico y experimental para evaluar la relación actividad antioxidante-estructura de anilinas sintéticas y la alquilación intramolecular de Friedel-Craft de *orto*-alil-N-benzilanilinas. Tesis de Doctorado, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia, **2008**, pp. 10-13.
- 41.** SHAHIDI, F. Natural antioxidants chemistry, health effects and applications. Boca Ratón, FL, EE.UU., **1997**, 414 p.
- 42.** JADHAV, S. J., NIMBALKAR, S. S., KULKARNI, A. D. y MADHAVI, D. L. Lipid oxidation in biological and food systems, *Food antioxidants: Technological, Toxicological and Health Perspectives*, **1996**, pp. 5-63.
- 43.** OKUBO, T., YOKOYAMA, Y., KANO, K., y KANO, I. Molecular mechanism of cell death induced by the antioxidant *tert*-butylhydroxyanisole in human monocytic leukemia U937 cells. *Biol. Pharma. Bull*, **2004**, 27, pp. 295-302.
- 44.** DELGADO, M., GONZÁLES, I.; SÁNCHEZ, R., and MARTÍNEZ, C. Analysis of synthetic phenolic antioxidants in edible oils by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Food Chem*, **2007**, 100, pp. 1722-1727.

45. IVERSON, F. *In vitro* studies on butylated hydroxyanisole. *Food Chem. Tox.*, **1999**, 37, pp. 993-997.
46. FRANKEL, E. D y MEYER, A. S. The problems of using onedi mensional methods to evaluate multifuntional food and biological antioxidants. *J. Sci. Food. Agric.*, **2000**, 80, pp. 1925-1941.
47. SÁNCHEZ, C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci. Tech. Int.*, **2002**, 8, pp. 121-137.
48. HUANG, D., OU, B., y PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, pp. 1841-1856.
49. PRIOR, R. L., WU, X., y SCHAICH, K. Standarization methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, pp. 4290-4302.
50. GHISELLI, A., SERAFINI, M., MAIANI, G., AZZINI, E. y FERROLUZZI, A. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radical Biol. Med.*, **1995**, 18, pp. 29-36.
51. RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., YANG, M., y RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assy. *Free Rad. Biol. Med.*, **1999**, 26, pp. 1231-1237.

52. OU, B., HAMPSCH-WOODILL, M. y PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49, pp. 4619-4626.
53. FRANKEL, E. N. In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in foods lipids. *Trends Food Sci. Technol.*, **1993**, 4, pp. 220-225.
54. PÉREZ, F. y PERMANYER, J. Estudio de las alteraciones termooxidativas de los aceites vegetales: aceite de oliva virgen y aceite de girasol refinado. *Grasas y Aceites*, **1986**, 37, pp. 29-32.
55. 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. *Grasas y Aceites*. **1991**, 42, pp. 379-386.
56. LIN, J. N.; KAO, C. H. Effect of oxidative stress caused by hydrogen peroxide on senescence of rice leaves. <http://ejournal.sinica.edu.tw/bbas/content/1998/3/bot93-03.pdf> [Consulta: 7 de septiembre de 2012].
57. FRANKEL, E. N. Review. Recent Advances in lipid Oxidation. *J. Sol. Food Agric.*, **1991**, 54, pp. 495-511.
58. SHERWIN, E.R. Oxidation and Antioxidants in Fat and Oil Processing. *JAACS*, **1978**, 55, pp. 809-814.

59. FRANKEL, E. Volatile Lipid Oxidation Products, *Prog. Lipid Res*, **1982**, 22, pp. 1-33.
60. MAKINEN, M. Lipid hydroperoxides: Effects of tocopherols and ascorbic acid on their formation and decomposition. Academic dissertation, University of Helsinki, Helsinki, **2002**. http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/maa/skemi/vk/makinen/lipidh_yd.pdf. [Consulta: 1 enero de 2012].
61. SHAIDI, F., JANITHA, P. K. y WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.*, **1992**, 32, pp. 67-103.
62. MILOS, M., MASTELIC, J., JERKOVIC, I. y KATALINIC, V. Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of oregano (*Origanum vulgare* L.) grown wild in Croatia. *Rivista Italiana Eppos*, **2000**, 71, pp. 617-624.
63. MILOS, M. y MAKOTA, D. Investigation of antioxidant synergisms and antagonisms among thymol, carvacrol, thymoquinone and *p*-cymene in a model system using the Briggs-Rauscher oscillating reaction. *Food Chem.*, **2012**, 131, pp. 296-299.
64. LAGOURI, V. y BOSKOU, D. Screening for antioxidant activity of essential oils obtained from spices. **1995**, Ed. G. Charalambous, Amsterdam, pp. 869-879.

65. VARDAR-ÜNLÜ, G., CANDAN, F., SOKMEN, A., DAFERERA, D., POLISSIOU, M., SOKMEN, M., DÖNMEZ, E. y TEPE, B. Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and metanol extracts of *Thymus pecticatus* Fisch. et Mey. Var. *Pectinatus* (Lamiaceae). *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, pp. 63-67.
66. GROSSO, C., OLIVEIRA, A.C., MAINAR, A. M., URIETA, J. S., BARROSO, J. G. y PALABRA, A. M. F. Antioxidant activities of the supercritical and conventional *Satureja montana* extracts. *J. Food Science*. **2009**, 74, pp. 713-714.
67. KULISIC, T., RADONIC, A., KATALINIC, V. y MILOS, M. Use of different methods for testing antioxidant activity of Oregano essential oil. *Food Chem.*, **2004**, 85, pp. 633-640.
68. HUANG, D., OU, B. y PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, pp. 1841-1856.
69. LADO, C., THEN, M., VARGA, I., SZŐKE, É. y SZENTMIHÁLYI, K. Antioxidant property of volatile oils determined by the ferric reducing ability. *Naturforsch*, **2004**, 56, pp. 354-358.
70. SAIJA, A., SCALESE, M., LANZA, M., MARZULLO, D., BONINA, F. y CASTELLI, F. Flavonoids as antioxidant agents: Importance of their interaction with biomembranes. *Free Radic. Biol. Med.*, **1995**, 19, pp. 481-486.

71. BORS, W., HELLER, W., MICHEL, C. y SARAN, M. Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* **1990**, 186, pp. 343-355.
72. SICHEL, G., CORSARO, C., SCALIA, M., DEBILIO, A. J. y BONOMO, R. P. *in vitro* scavenger activity of some flavonoids and melanins against O₂. *Free Rad. Biol. Med.*, **1991**, 11, pp. 1-8.
73. RATTY, A. K. y DAS, N. P. Effects of flavonoids on non-enzymatic lipid peroxidation: Structure-activity relationship. *Biochem. Med. Metab. Biol.*, **1988**, 39, pp. 69-79.
74. PAULINO, M., ROJAS, C., PAULA, S., ELINGOLD, I., ALVAREDA, E., CASANOVA, M. B., IRIBARNE, F., AGUILERA, S. y DUBIN, M. Phenolic contents and antioxidant activity in central-southern uruguayan propolis extracts. *J. Chil. Chem. Soc.*, **2010**, 55, pp. 147-14.
75. FERRALI, M., SIGNORINI, C., CACIOTTI, B., SUGHERINI, L., CICCOLI, L., GIACHETTI, D. y COMPORTI, M. Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Lett.*, **1997**, 416, pp. 123-129.
76. SESTILI, P., GUIDARELLI, A., DACHA, M. y CANTONI, O. Quercetine prevents DNA single strand breakage and cytotoxicity caused by tert-butylhydroperoxide: free radical scavenging versus iron chelating mechanism. *Free Radic. Biol. Med.*, **1998**, 25, pp. 196-200.

77. HUK, I., BROVKOVYCH, V., NANOBASH, V. J., WEIGEL, G., NEUMAYER, C., PARTYKA, L., PATTON, S. y MALINSKI, T. Bioflavonoid quercetin scavenges superoxide and increases nitric oxide concentration in ischaemia-reperfusion injury: an experimental study. *Br. J. Surg.* **1998**, 85, pp. 1080-1085.
78. AHEME, S. A. Y O'BRIEN, N. M. Mechanism of protection by the flavonoids, quercetin and rutin, against *ter*-butylhydroperoxide and metanodione-induced DNA single strand breaks in Caco-2 cells. *Free Rad. Biol. Med.*, **2000**, 29, pp. 507-514.
79. DA SILVA, E. L., TSUSHIDA, T. y TERAQ, J. Inhibition of mammalian 15-lipoxygenase dependent lipid peroxidation in low density lipoprotein by quercetin and quercetin monoglucosides. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1998**, 349, pp. 313-320.
80. NAGAO, A., SEKI, M. y KOBAYASHI, H. Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1999**, 63, pp. 1787-1790.
81. MYHRSTAD, M. C., CARLSEN, H., NORDSTROM, O., BLOMHOFF, R. y MOSKAUG, J. O. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Radic. Biol. Med.*, **2002**, 32, pp. 386-393.
82. SFORCIN, J. M. Propolis and the immune system: a review. *J. Ethnopharmacology*, **2007**, 113, pp. 1-14.

- 83.** HAYEK, T., FUHRMAN, B., VAYA, J., ROSENBLAT, M., BELINKY, P., COLEMAN, R., ELIS, A. y AVIRAM, M. Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice after consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, **1997**, 17, pp. 2744-2752.
- 84.** CHOPRA, M., FITZSIMONS, P., STRAIN, J., THURNHAM, D. y HOWARD, A. Nonalcoholic red wine extract and quercetin inhibit LDL oxidation without affecting plasma antioxidant vitamin and carotenoid concentrations. *Clin, Chem.*, **2000**, 46, pp. 1162-1170.
- 85.** ACKER, F. A. A., SCHOUTEN, O., HAENEN, G. R. M., VAN DER VIJGH, W. J. F. Y BAST, A. Flavonoids can replace α -tocopherol as an antioxidant. *FEBS Lett.*, **2000**, 473, pp. 145-148.
- 86.** TSARKOVA, T. Desarrollo de la técnica de extracción de metabolitos secundarios de las plantas aromáticas utilizando la radiación de microondas. Tesis de maestría, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia, **1997**, pp. 13-36.
- 87.** HERTOOG, MG.; HOLLMAN, P.C. y VENEMA, D.P; Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits, *J. Agric. Food Chem.*, **1992**, 40, pp. 1591-1598.

- 88.**ARIAS, G. Estudio de la composición química y la actividad antioxidante de aceites esenciales y extractos aislados de *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris* y *Lippia citriodora*, cultivadas en el municipio Sucre (Santander). Tesis de maestría. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia, **2012**, pp. 59-75
- 89.**OLIVEIRA, D.N., LETAIGO, G.G., BIZZO, H.R., LOPEZ, D., ALVIANO, C.S., ALVIANO: D.S., y LEITAO, S.G., Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* H.B.K., *Food Chem.*, **2007**, pp. 101, 236-240.
- 90.**MORAIS, A., MOURAO, J., GOTTLIEB. O., SILVA. M., MARX. M., MAIA. J. Óleos essenciais da Amazônia contendo timol. *Acta Amazonica*, **1972**, 2, pp. 45–46.
- 91.**GALLINO, M. Una Verbenacea Essenziera Ricca in Timolo: *Lippia organoides* H.B.K. *Essenze Derivati Agrumari*, **1987**, 57, pp. 628–629.
- 92.**FLEISHER, A. Y SNEER. N. Oregano spices and *Origanum* chemotypes. *J. Jci. Food Agric.*, **1982**, 33, pp. 441–446.
- 93.**MATOS, F., MACHADO, M., CRAVEIRO, A. y ALENCAR, J. The essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in Northeast Brazil. *J. Essent. Oil Res.*, **1996**, 8, pp. 695–698.

94. ZOGHBI, M., ANDRADE, E., SANTOS, A., SILVA, M. y MAIA, J. Essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown growing wild in Brazilian Amazon. *Flavour Fragr. J.*, **1998**, 14, pp. 411–414.
95. EDRIS, A., SHALABY, A., FADEL, H. y ABDEL, M. Evaluation of a chemotype of spearmint (*Mentha spicata* L.) grown in Siwa Oasis, Egypt. *Eur. Food Res. Techn.*, **2003**, 218, pp. 74–78.
96. SANTOS, F., LOPES, J., CITO, A., OLIVEIRA, E. y REIS, F. Composition and biological activity of essential oils from *Lippia organoides* H.B.K. *J. Essen. Oil Res.*, **2004**, 16, pp. 504–506.
97. GALVIS, L.; ZAPATA, B.; BAENA, A.; RUIZ, C.; BUENO, J.; STASHENKO, E. y MESA, A. C. Antifungal, citotoxic and chemical analyses of essential oils of *Lippia organoides* H.B.K grown in Colombia. *Salud UIS*, **2011**, 43, pp.141-148.
98. ESCOBAR, P.; LEAL, S.; HERRERA, L. V.; MARTINEZ, J. y STASHENKO, E. Chemical composition and antiprotozoal activities of colombian *Lippia spp.* essential oils and their major components. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **2010**, 105, pp. 184-190.
99. ACEVEDO, A.; KOUZNETSOV, V. y STASHENKO, E. Composición y capacidad antioxidante in- vitro de aceites esenciales ricos en timol, carvacrol, trans-anetol o estragol. *Salud UIS*, **2009**, 41, pp. 287-294.

- 100.**POULOSE, A. J. y CROTEAU, R. Biosynthesis of aromatic monoterpenes. Conversion of γ -terpinene to p-cymene and thymol in *Tymus vulgaris* L. *Arch. of Biochem. Biophys.*, **1978**. 187, pp. 307-314.
- 101.**TAINTER, D. R. y GRENIS, A. T. Spices and seasonings. 1993, VCH publishers Inc., New York. pp. 251.
- 102.**CALA, M. Determinación de antioxidantes fenólicos en plantas aromáticas del genero *Lippia sp.* (Familia Verbenaceae) empleando cromatografía de gases y cromatografía líquida de alta eficiencia. Tesis de posgrado. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia. **2011**, pp. 152-180.
- 103.**STASHENKO, E. E., MARTÍNEZ, J. R., RUÍZ, C. A.; ARIAS, G., DURÁN, C.. SALGAR, W., CALA, M. *Lippia organoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis, *J. Sep.Sci.*, **2009**, 33, pp. 93-103.
- 104.**RUÍZ, C., Estudio de los metabolitos secundarios volátiles de *Lippia organoides* H.B.K., en tres estados fenológicos, Trabajo de Grado. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia, **2008**, pp. 22-43.
- 105.**DENISOV, E. T. y AFANAS´EV, I. B. Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology. 2005, Ed. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU. pp. 466-488.

- 106** .MUÑOZ, A., .CASTAÑEDA. M., BLANCO. K., CARDENAS. C., REYES. J., KOUZNETSOV. V. y STASHENKO. E. Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol. *Scientia et Technica*, **2007**, 33, pp. 125-128.
- 107**. YANISHLIEVA, N. V. Inhibiting oxidation in: Antioxidants in Food Practical Applications, *Wood-head Publishing*, Cambridge, **2001**, pp. 22-70.
- 108**.NINFALI, P., BACCHIOCCA, M., BIAGIOTTI, E., SERVILI, M. y MONTEDORO, G. Validation of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Parameter as a New Index of Quality and Stability of Virgin Olive Oil. *JAOCS*, **2002**, 79, pp. 977-981.
- 109**.JIMÉNEZ, D., GIUFFRIDA. F., GOLAY. P., COTTING. C., LARDEAU. A. y BRENDAN. K. Antioxidant activity of orégano, parsley, and olive mill wastewaters in bulk oils and oil-in-water emulsions enriched in fish oil. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, pp. 7151–7159.
- 110**.FRANKEL, E.; KANNER, J. y KINSELLA, J. Inhibition *in vitro* of oxidation of human low density lipoproteins by phenolic substances in wine. *Lancet*, **1993**, 341, pp. 1-4.
- 111**.MANGIAPANE, H.; THOMPSON, J.; BROWN, S., BELL, G. D y WHITE, D. A. The inhibition of LDL oxidation by naturally occurring flavonoids. *Biochem. Pharmacol.*, **1992**, 43, pp. 445-452.

- 112.RENAUD, S. Y LORGERI, M. Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, **1992**, 339, pp. 1523-1526.
- 113.STEINBERG, D. Antioxidants in the prevention of human atherosclerosis. *Circulation*, **1988**, 85, pp. 2338-2344.
- 114.TROUILLAS, P., MARSAL, P., SIRI, D., LAZZARONI, R. y DUROUX, J. Study of the reactivity of OH groups in quercetina and taxifolin antioxidants: The specificity of the 3-OH site. *Food Chemistry*. **2006**. 97, pp. 679-688.
- 115.ALFARO, M. Estudio de reactividad de luteolina en su estado libre y formando complejos de inclusión con ciclodextrinas. Trabajo de Grado. Universidad de Chile, Santiago de Chile, Chile, **2009**, pp. 51-66.
- 116.CHEN, Z. Y., CHAN, P. T., HO, K. Y., FUNG, K. P. y WANG, J. Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic groups. *Chem. Phys. Lipids*, **1996**, 79, pp. 157-163.
- 117.LI, S., CHERIAN, G., AHN, D., HARDIN, R. y SIM, J. Storage, heating and tocopherols affect cholesterol oxide formation un food oils. *J. Agric. Food Chem.*, **1996**, 44, pp. 3830-3834.
- 118.SHOZEN, K., OHSIMA, T., USHIO, H., TAKIGUCHI, A. y KOIZUMI, C. Effects of antioxidants and packing on cholesterol oxidation in processed anchovy during storage. *Food Sci. Techn.*, **1997**, 30 (1), pp. 2-8.

- 119.**DURÁN, R. y BORJA, R. Actividad antioxidante de las vitaminas C y E y de la provitamina A. *Grasas y Aceites (C.S. I. C)*, **1993**, 44, pp. 107-111.
- 120.**SUÁREZ, M. y RUEDA, J. El papel del selenio y la vitamina E en la prevención y tratamiento del cáncer de próstata. *Rev. Costarric. Salud Pública*, **2004**, 13 (24), pp. 1409-1429.
- 121.**FRANKEL, E. N., HUANG, S. W., KANNER, J. y GERMAN, J. B. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils versus emulsions. *J. Agric. Food Chem.*, **1994**, 42, pp. 1054-1059.
- 122.**KOLEVA, I., VAN BEEK, T. A., LINSSEN, J. P., DE GROOT, A. y EVSTATIEVA, L. N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem. Analysis*, **2002**, 13, pp. 8-17.
- 123.**NIETO, S., GARRIDO, A., SANHUEZA, J., LOYOLA, L. A., MORALES, G., LEIGHTON, F. y VALENZUELA, A. Flavonoids as stabilizers of fish oil: an alternative to synthetic antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*,**1993**, 70, pp. 773-778.
- 124.**RESURRECCION, A. V. A. y REYNOLDS, A. E. Evaluation of natural antioxidants in frankfurters contained chicken and pork. *J. Food Sci.*, **1990**, 55, 629-631.

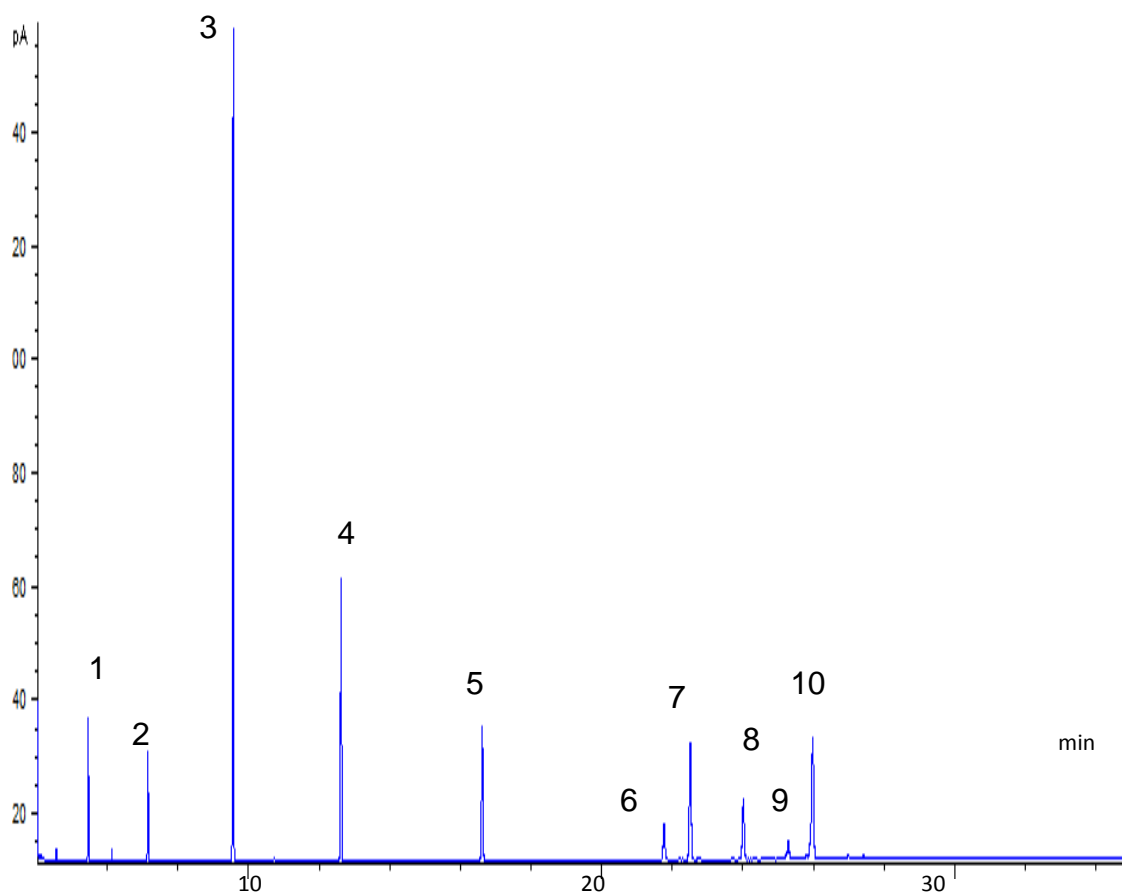
- 125.**SHAIDI, F., WANASUNDARA, P. y HONG, C. Antioxidant activity of phenolic compounds in meat model systems. *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health. Agric. Food Chem.*, **1992**, 1, pp. 214-222.
- 126.**RAMANATHAN, L., DAS, N. P. y LI, Q. T. Studies on lipid oxidation in fish phospholipid liposomes. *Biol. Trace Element Res.*,**1994**, 40,pp. 59-70.
- 127.**VEKIARI, S. A., OREOPOULOU, V., TZIA, C. y THOMPOULOS, C. D. Oregano flavonoids as lipid antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1993**, 70, pp. 287-483.
- 128.**WANG, P. F. y ZHENG, R. L. Inhibition of the autoxidation of linoleic acid by flavonoids in micelles. *Chem. Phys. Lipids*, **1992**, 63, pp. 37-40.
- 129.**RANKIN, S. A. y PIKE, O. A. Cholesterol autoxidation inhibition varies among several natural antioxidants in an aqueous model system. *J. Food Sci.*, **1993**, 58, pp. 653-655.
- 130.**HEIM, K.E., TAGLIAFERRO, A.R. y BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J.Nutr.Biochem.***2002**, 13, pp. 572-584.
- 131.**RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J. Y PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic.Biol.Med.* **1996**, 20, pp. 933-956.

- 132.**SALGAR, W. Evaluación en dos sistemas lipídicos modelo de la actividad antioxidante *in vitro* de aceites esenciales extraídos de plantas pertenecientes a la familia Labiatae, Trabajo de maestría, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia, **2001**, pp. 60-74.
- 133.**ROJAS, V. y SANTAMARÍA, A. Estudio del uso de mezclas de aceites esenciales y extractos de *Lippia origanoides*, *Rosmarinus officinalis* y *Salvia officinalis* como antioxidantes naturales en cremas cosméticas. Trabajo de grado, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia, **2011**, pp. 74-85.
- 134.**ESCAMILLA, C., JIMÉNEZ, E., CUEVAS, Y. y FONSECA, J. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev. Fac. Med.* **2009**, 52, pp. 73-75.

ANEXOS

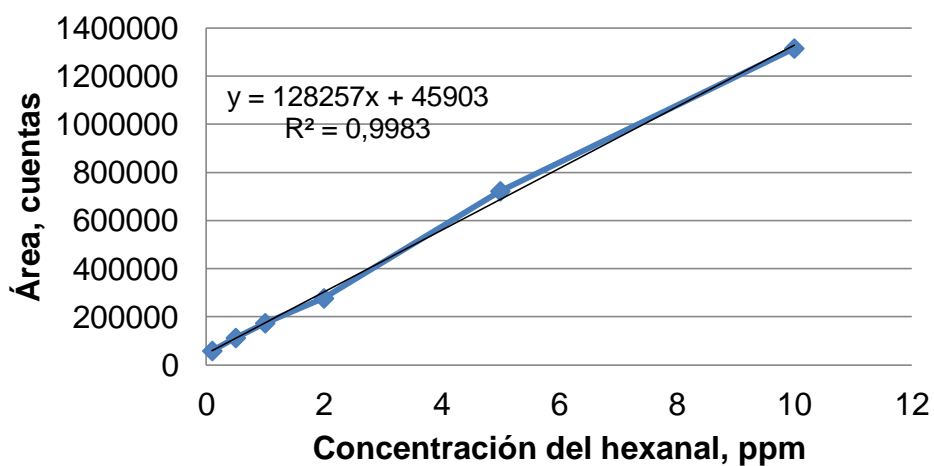
ANEXO A. PERFIL CROMATOGRÁFICO DE LOS ÁCIDOS GRASOS PRESENTES EN EL ACEITE DE SEJE.

Figura 1.1. Perfil cromatográfico de los FA presentes en el aceite de seje. Columna DB-5 (60m), *Split* 1:30. FID. 1- Ácido caproico, 2- Ácido caprílico, 3- Ácido cáprico, 4- Ácido láurico, 5- Ácido mirístico, 6- Ácido palmítico, 7- Ácido esteárico, 8- Ácido oléico, 9- Ácido linoléico y 10- Ácido linolénico.



ANEXO B. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL HEXANAL REALIZADA POR GC-ECD.

Figura 2.1. Curva de calibración del hexanal.



ANEXO C. PERFILES CROMATOGRÁFICOS, OBTENIDOS POR GC-ECD DEL HEXANAL ANALIZADO EN FORMA DE SU DERIVADO HIDRAZÓNICO, GENERADOS EN EL ACEITE DE SEJE SOMETIDO A LA RADIACIÓN UVA.

Figura 3.1. Perfil cromatográfico de los productos secundarios generados en el aceite de seje con AE de *Lippia origanoides*, quimiotipo carvacrol.

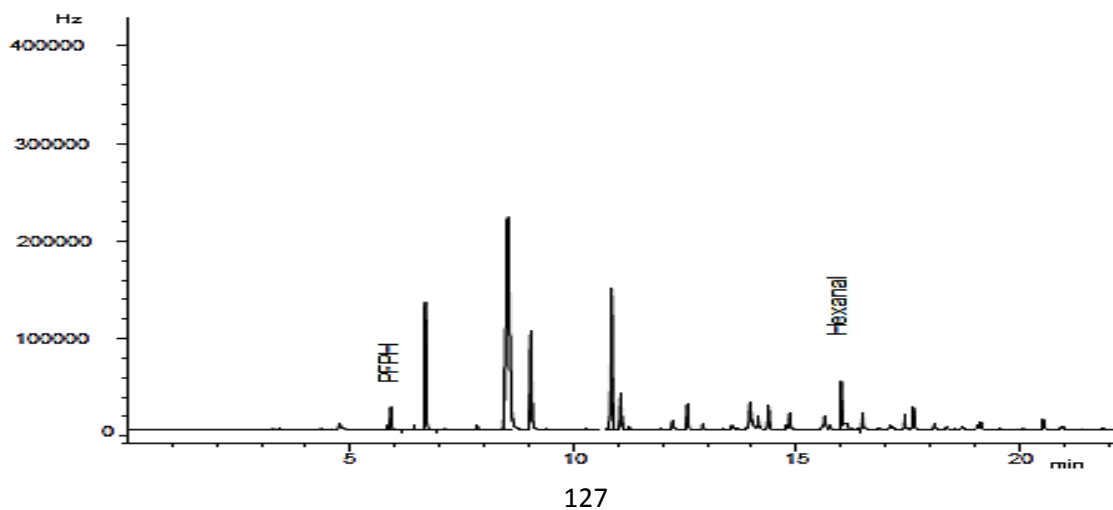


Figura 3.2. Perfil cromatográfico de los productos secundarios generados en el aceite de seje sometido con aceite esencial de *Lippia organoides*, quimiotipo timol.

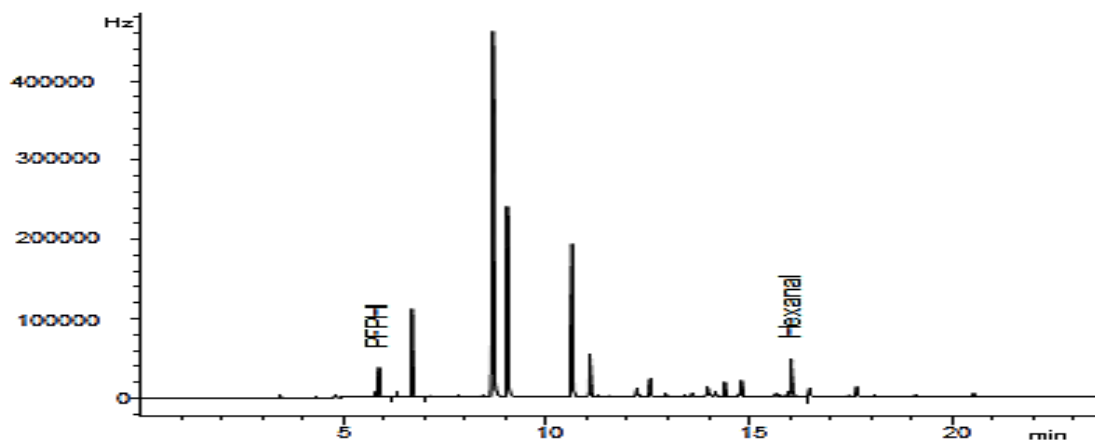


Figura 3.3. Perfil cromatográfico de los productos secundarios generados en el aceite de seje con aceite esencial de *Lippia organoides*, quimiotipo felandreno.

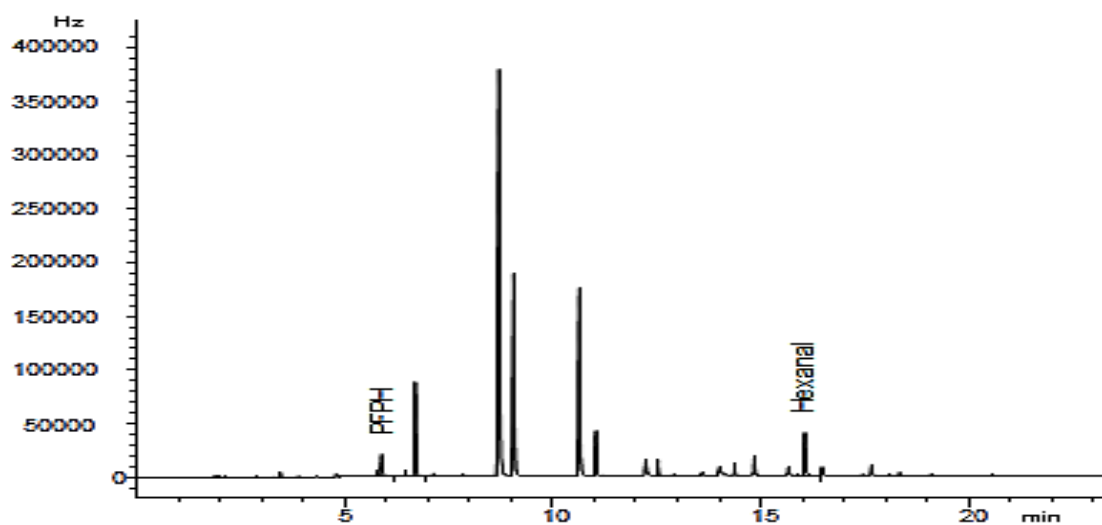


Figura 3.4. Perfil cromatográfico de los productos secundarios generados en el aceite de seje con BHT.

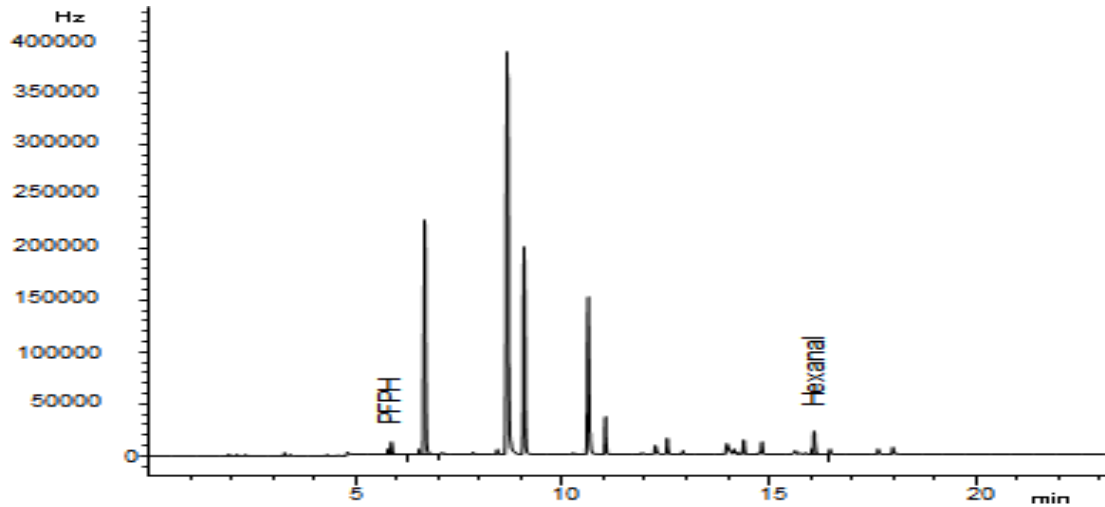


Figura 3.5. Perfil cromatográfico de los productos secundarios generados en el aceite de seje con α -tocoferol.

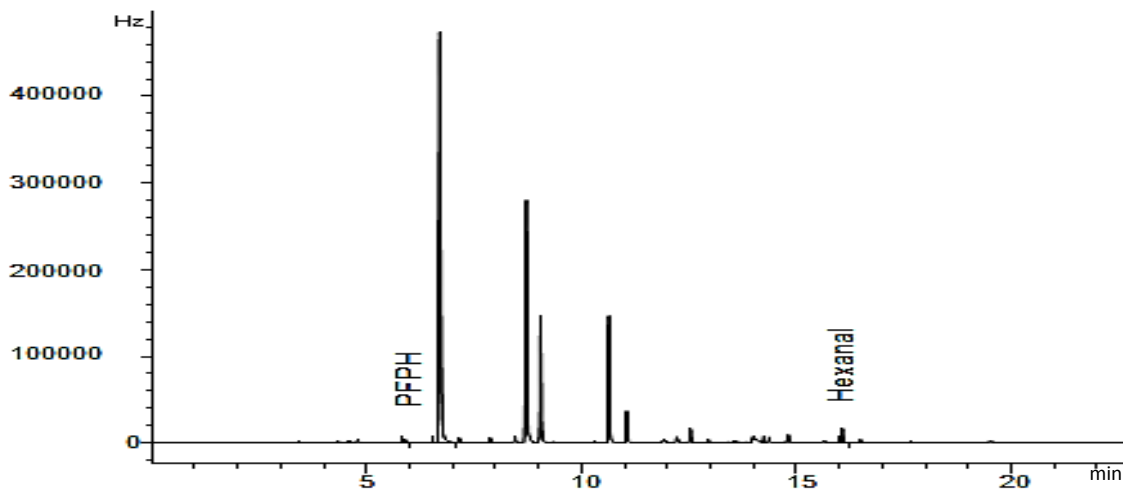


Figura 3.6. Perfil cromatográfico de los productos secundarios generados en el aceite de seje con extracto de *Lippia origanoides*, quimiotipo timol.

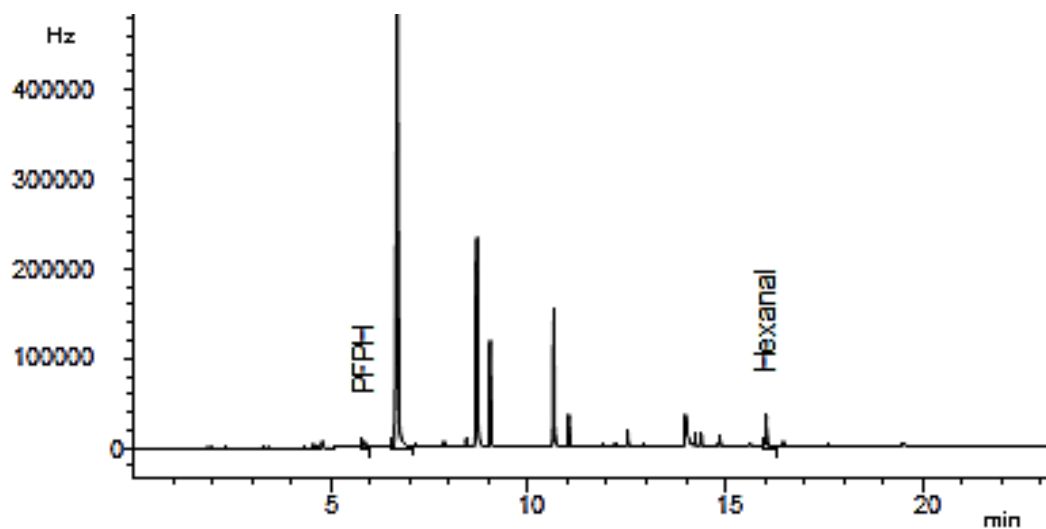


Figura 3.7. Perfil cromatográfico de los productos secundarios generados en el aceite de seje con extracto de *Lippia origanoides*, quimiotipo carvacrol.

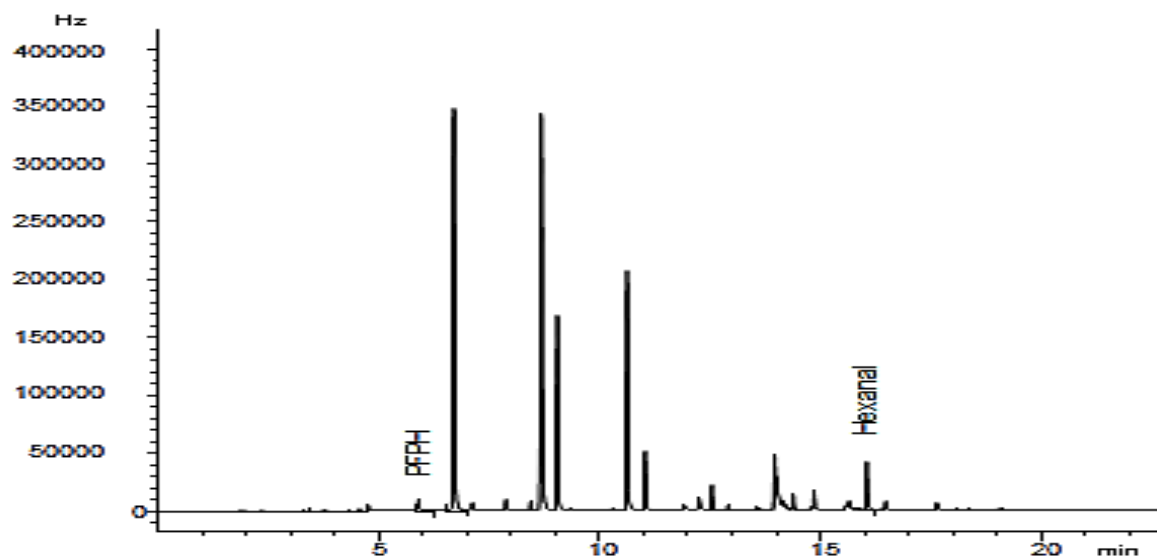


Figura 3.8. Perfil cromatográfico de los productos secundarios generados en el aceite de seje con extracto de *Lippia origanoides*, quimiotipo felandreno.

