

# **EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA OLEORRESINA DEL ORÉGANO**

**(*Origanum vulgare*)**

**Presentado por:**

**MÓNICA ALEJANDRA SALAMANCA GARCÍA**  
**MARLLY YURANNY SÁNCHEZ BERMÚDEZ**

**Director:**

**NELSON CONTRERAS CORONEL**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA**  
**FACULTAD DE TECNOLOGÍA**  
**ECUELA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA**  
**GRUPO DE OLEOQUÍMICA**  
**Pereira, 2009**

**EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA OLEORRESINA DEL ORÉGANO**  
**(*Origanum vulgare*)**

**Presentado por:**

**MÓNICA ALEJANDRA SALAMANCA GARCÍA**  
**MARLLY YURANNY SÁNCHEZ BERMÚDEZ**

**TRABAJO DE GRADO**

**Requisito parcial para optar al título de Tecnólogo en Química.**

**Director:**

**NELSON CONTRERAS CORONEL**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA**  
**FACULTAD DE TECNOLOGÍA**  
**ECUELA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA**  
**GRUPO DE OLEOQUÍMICA**  
**Pereira, 2009**

**NOTA DE ACEPTACIÓN DEL TRABAJO DE GRADO**

**EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA OLEORRESINA DEL ORÉGANO  
(*Origanum vulgare*)**

**Presentado por:**

**MONICA ALEJANDRA SALAMANCA GARCÍA  
MARLLY YURANNY SÁNCHEZ BERMÚDEZ**

**Los suscritos directores y jurados del presente trabajo de grado, una vez revisada la versión escrita y presentando la sustentación oral, decidimos otorgar:**

**La nota de:** \_\_\_\_\_

**Con la connotación** \_\_\_\_\_

**Para constancia firmamos en la ciudad de Pereira hoy** \_\_\_\_\_

**Director:** \_\_\_\_\_

**Nombre: Nelson Contreras Coronel**

**Jurado:** \_\_\_\_\_

**Nombre: Oscar Marino Mosquera**

## DEDICATORIA

*A Dios, a mi mamá María Gladys, a mis hermanos Cindy, Anyeli, Linyani, Julián, por compartir conmigo esta grandiosa vida, su gran apoyo y el amor que me han brindado en todos estos días. Ya mi futura familia con mi novio Miguel y nuestra Bebé, porque son y serán mi alegría y mis nuevas ganas de vivir. ¡Los amo!*

*Marlly*

## DEDICATORIA

*A Dios, a mis padres que siempre me han apoyado con su amor incondicional en mi formación como persona íntegra; quienes en mis errores me aconsejan y en mis triunfos me fortalecen, a mis hermanas Carolina y Natalia que siempre me alientan con su ternura y sinceridad.*

*En general a todas las personas que hicieron parte de mi formación intelectual y al desarrollo de mi trabajo.*

*Mónica Alejandra*

## **AGRADECIMIENTOS**

A todas las personas citadas a continuación que de alguna u otra forma facilitaron la realización de esta investigación:

A nuestro director Nelson Contreras Coronel M.Sc. por su asesoría, entrega y paciencia

A nuestra profesora Gloria Edith guerrero Ph.D. por su valiosa orientación, preocupación y apoyo.

A María Victoria Sánchez Licenciada en Áreas Técnicas (profesional de la sala de reactivos) por el suministro de los reactivos necesarios para desarrollar esta investigación.

A Javi (Administrador del Almacén) por toda su paciencia, ayuda y facilitación de los servicios.

Al evaluador y a los jurados por sus observaciones y consejos.

A todos los profesores que hicieron parte de nuestro aprendizaje y aportaron sus conocimientos en la realización de este trabajo.

A Hugo Arias por su ayuda y accesoria en el Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas.

## CONTENIDO

	Pág.
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>I</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURA</b>	<b>II</b>
<b>ÍNDICE DE ANEXOS</b>	<b>III</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>V</b>
<b>1. MARCO TEORÍCO</b>	<b>17</b>
1.1 Generalidades del orégano ( <i>Origanum vulgare</i> )	17
1.2 Quimiotaxonomía del género <i>Origanum</i>	20
1.3 Actividad biológica de los componentes del orégano	21
1.3.1 Antioxidante	21
1.3.2 Potencial antimicrobiano	22
1.3.3 Las oleorresinas	23
1.4 Metodologías de análisis	25
1.4.1 Análisis físico-químicos	25
1.4.2 Análisis microbiológicos	27
1.5 Métodos de extracción	28
1.5.1 Extracción Soxhlet	28
1.5.2 Extracción por maceración pasiva	28
1.6 Análisis instrumental	29
1.6.1 Métodos de separación Cromatográfica	29
1.7 Identificación del problema	32
1.8 Objetivos	33
1.8.2 Objetivos específicos	33
1.9 Justificación	34
<b>2. SECCION EXPERIMENTAL</b>	<b>37</b>
2.1 Materiales y métodos	37
2.1.1 Materiales	37

2.1.1.1 Solventes empleados	37
2.1.1.2 Condiciones instrumentales generales	37
2.1.1.3 Material vegetal	38
2.1.1.3.1 Aspectos agroecológicos del cultivo	38
2.1.1.3.2 Obtención del material vegetal	39
2.2 Metodología	39
2.2.1 Sitio de realización del trabajo	39
2.2.2 Tratamiento y acondicionamiento de la muestra	40
2.3 Obtención de la oleorresina de orégano	43
2.3.1 Proceso de extracción Soxhlet	44
2.3.2 Proceso de extracción por maceración pasiva	44
2.3.3 Análisis organoléptico	45
2.4 Análisis fisicoquímicos y microbiológicos de la oleorresina	45
2.4.1 Determinaciones fisicoquímicas	45
2.4.1.1 Humedad del material vegetal	45
2.4.1.2 Humedad del la oleorresina	45
2.4.1.3 Cenizas	46
2.4.1.4 Densidad	46
2.4.1.5 Índice de refracción	46
2.4.1.6 Índice de acidez	46
2.4.1.7 Actividad antioxidante	46
2.4.2 Caracterización Química	47
2.4.2.1 Análisis por GC- MS	47
2.4.2.2 Preparación de la muestra	47
2.4.2.3 Condiciones de análisis	47
2.4.3 Análisis microbiológicos	49
2.4.3.1 Determinación de Mesófilos aerobios viables	49
2.4.3.2 Determinación de Mohos y Levaduras	49
2.4.3.3 Determinación de Coliformes totales	50
2.4.3.4 Determinación de Coliformes Fecales	50



2.5 Estabilidad	50
<b>3. DISCUSION Y RESULTADOS</b>	<b>51</b>
3.1 Extracción de la oleorresina	51
3.1.1 Extracción Soxhlet	51
3.1.2 Extracción por maceración pasiva	54
3.1.3 Extracción Soxhlet material húmedo	55
3.1.4 Extracción por maceración pasiva del material vegetal húmedo	56
3.1.5 Comparación de los porcentajes de rendimiento de la oleorresina de Orégano empleando el método de extracción Soxhlet y maceración pasiva (material vegetal seco)	58
3.1.6 Comparación de los porcentajes de rendimiento de la oleorresina de Orégano empleando el método de extracción Soxhlet y maceración pasiva (material vegetal húmedo)	59
3.2 Comparaciones del rendimiento de la oleorresina de orégano con otras oleorresinas	61
3.2.1 Comparación de los porcentajes de rendimiento de la oleorresina de Orégano ( <i>Origanum vulgare</i> ) con la oleorresina de ajo blanco ( <i>Allium sativum</i> ) empleando el método Soxhlet	61
3.2.2 Comparación de los porcentajes de rendimiento de la oleorresina de Orégano ( <i>Origanum vulgare</i> ) con la oleorresina de ajo blanco ( <i>Allium sativum</i> ) empleando el método por maceración pasiva	61
3.2.3 Comparación de los porcentajes de rendimiento de la oleorresina de Orégano ( <i>Origanum vulgare</i> ) con la oleorresina de ajo morado ( <i>Allium sativum</i> ) empleando el método Soxhlet	62
3.2.4 Comparación de los porcentajes de rendimiento de la oleorresina de Orégano ( <i>Origanum vulgare</i> ) con la oleorresina de ajo morado ( <i>Allium sativum</i> ) empleando el método por maceración pasiva	62
3.3 Análisis organoléptico	63
3.3.1 Comparación del análisis sensorial de la oleorresina de orégano con otras oleorresinas	64

3.4 Análisis físico-químicos de la oleorresina de orégano	65
3.4.1 Humedad de la planta de orégano	65
3.4.2 Humedad en la Oleorresina de orégano	66
3.4.3 Porcentaje de cenizas presentes en la oleorresina de orégano	66
3.4.4 Densidad de la oleorresina de orégano	67
3.4.5 Índice de refracción y sólidos solubles (Grados Brix) de la oleorresina de orégano	67
3.4.6 Índice de acidez de la oleorresina de orégano	68
3.4.7 Propiedad antioxidante de la oleorresina de orégano	69
3. 5 Análisis microbiológicos	70
3.5.1 Análisis de Mesófilos, Mohos y Levaduras	70
3.5.2 Determinación de coliformes totales y coliformes fecales E-coli	72
3.6 Análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-MS) de la oleorresina del orégano	74
3.6.1 Elucidación estructural de los compuestos de la oleorresina de orégano presentes en la fracción de hexano y acetonitrilo	74
3.6.2 Comparación De Los Compuestos Obtenidos Por GC-MS De La Oleorresina Del Orégano Con Las Oleorresinas De Ajo Blanco Y Pimentón	80
<b>4. CONCLUSIONES</b>	<b>81</b>
<b>5. RECOMENDACIONES</b>	<b>82</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>83</b>
<b>7. ANEXOS</b>	<b>90</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Características de varios tipos de orégano.	20
<b>Tabla 2.</b> Metabolitos secundarios presentes en las especies del género <i>Origanum</i> .	21
<b>Tabla 3.</b> Parámetros microbiológicos de las especias y sus derivados.	25
<b>Tabla 4.</b> Ventajas y desventajas de los métodos de extracción (Soxhlet, maceración pasiva)	29
<b>Tabla 5.</b> Solventes empleados para las extracciones Soxhlet, maceración pasiva	37
<b>Tabla 6.</b> Condiciones instrumentales generales	38
<b>Tabla 7.</b> Extracción Soxhlet, material vegetal seco.	52
<b>Tabla 8.</b> Resultado del análisis ANOVA y el test de comparación múltiple de Tukey	54
<b>Tabla 9.</b> Extracción por maceración pasiva, material vegetal seco.	54
<b>Tabla 10.</b> Resultado del análisis ANOVA y el test de comparación múltiple de Tukey	55
<b>Tabla 11.</b> Extracción soxhlet, material vegetal húmedo	55
<b>Tabla 12.</b> Extracción por maceración pasiva, material vegetal húmedo.	57
<b>Tabla 13.</b> Resultado del análisis ANOVA para el método Soxhlet y Maceración pasiva (material seco)	58
<b>Tabla 14.</b> Resultado del análisis ANOVA para el método Soxhlet y Maceración pasiva (material húmedo)	60
<b>Tabla 15.</b> Análisis organoléptico de material vegetal seco y húmedo.	63
<b>Tabla 16.</b> Análisis organoléptico de la oleorresina del ajo blanco y ajo morado	64
<b>Tabla 17.</b> Porcentaje de humedad de la planta de orégano	65
<b>Tabla 18.</b> Porcentaje de humedad en la Oleorresina de orégano	66
<b>Tabla 19 .</b> Porcentaje de cenizas en la oleorresina de orégano	67
<b>Tabla 20.</b> Densidad de la oleorresina de orégano	67

<b>Tabla 21.</b> Índice de refracción de la oleorresina de orégano	68
<b>Tabla 22.</b> Índice de acidez de la oleorresina de orégano	69
<b>Tabla 23.</b> Propiedad antioxidante de la oleorresina de orégano.	69
<b>Tabla 24.</b> Recuento de Mohos y Levaduras en la oleorresina de orégano	71
<b>Tabla 25.</b> Recuento de Mesófilos aerobios viables en la oleorresina de orégano	72
<b>Tabla 26.</b> Prueba presuntiva para E- coli en la oleorresina de orégano	72
<b>Tabla 27.</b> Determinación de Coliformes Fecales en la oleorresina de orégano	73
<b>Tabla 28.</b> Compuestos presentes en la fracción de hexano y acetonitrilo	75
<b>Tabla 29.</b> Estructura de los compuestos presentes en las fracciones de Hexano y Acetonitrilo de la Oleorresina del Orégano	78
<b>Tabla 30.</b> Estructuras del Timol y su correspondiente isómero el Carvacrol presentes en las plantas Lamiaceae	79

## INDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Superficie Cultivada y Distribución Geográfica del Cultivo de Orégano en Colombia.	18
<b>Figura 2.</b> Condiciones óptimas para el cultivo del Orégano	18
<b>Figura 3.</b> Cultivo del Orégano de la vereda el Cedralito-Santa Rosa de Cabal	39
<b>Figura 4.</b> Selección del material vegetal, que será objeto de estudio	40
<b>Figura 5.</b> Proceso de desinfección del Orégano.	41
<b>Figura 6.</b> Secado del Orégano en la estufa.	42
<b>Figura 7.</b> Picado del Orégano.	42
<b>Figura 8.</b> Esquema del acondicionamiento y tratamiento de la muestra de Orégano.	43
<b>Figura 9.</b> Porcentajes de rendimiento de la oleorresina de orégano, empleando el método Soxhlet y el material vegetal seco.	53
<b>Figura 10.</b> Porcentajes de rendimiento de la oleorresina de orégano, empleando el método Soxhlet y el material vegetal Húmedo.	56
<b>Figura 11.</b> Porcentajes de rendimiento de la oleorresina de orégano, empleando el método por maceración pasiva y el material vegetal húmedo.	57
<b>Figura 12.</b> Porcentajes de rendimiento de la oleorresina de orégano, empleando el método Soxhlet y por Maceración pasiva (material vegetal Húmedo).	59
<b>Figura 13.</b> Porcentajes de rendimiento de la oleorresina de orégano, empleando el método Soxhlet y por maceración pasiva (material vegetal Húmedo).	60
<b>Figura 14.</b> Propiedad antioxidante del extracto del orégano.	70
<b>Figura 15.</b> Región de 6,5 a 9,5 del TIC de las fracciones de Hexano y Acetonitrilo de la Oleorresina del Orégano	74
<b>Figura 16.</b> Tiempo de retención del compuesto, hallado en las fracciones de hexano y acetonitrilo	75

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO A:</b> Tabla del porcentaje de rendimiento de la extracción de ajo blanco por medio de la extracción solido-liquido Soxhlet.	90
<b>ANEXO B:</b> Tabla del porcentaje de rendimiento de la extracción de ajo blanco por medio de la extracción por maceración pasiva.	90
<b>ANEXO C:</b> Tabla del porcentaje de rendimiento de la extracción de ajo morado por medio de la extracción solido-liquido Soxhlet.	90
<b>ANEXO D:</b> Tabla del porcentaje de rendimiento de la extracción de ajo morado por medio de la extracción por maceración pasiva.	91
<b>ANEXO E:</b> Tabla del porcentaje de cenizas de la oleorresina de ajo blanco	91
<b>ANEXO F:</b> Tabla del índice de refracción y el porcentaje de grados Brix presentes en la oleorresina de ajo blanco.	91
<b>ANEXO G:</b> tabla del índice de acidez de la oleorresina de ajo blanco.	91
<b>ANEXO H:</b> tabla del índice de acidez de la oleorresina de pimentón rojo y berenjena.	92
<b>ANEXO I.</b> Espectro de masas del compuesto timol de la oleorresina de orégano encontrado en la fracción de hexano, acetonitrilo.	92
<b>ANEXO J.</b> Espectro de masas del compuesto 2,5-Ciclohexadiene-1,4-dione, 2-metil-5-(1-metiletill) de la oleorresina de orégano encontrado en la fracción de hexano, acetonitrilo.	92
<b>ANEXO K.</b> Espectro de masas del compuesto 3-Ciclohexen-1-ol, 4-metil-1-(1-metiletill) de la oleorresina de orégano encontrado en la fracción de hexano, acetonitrilo.	93
<b>ANEXO L.</b> Espectro de masas del compuesto Borneol de la oleorresina de orégano encontrado en la fracción de hexano, acetonitrilo	93
<b>ANEXO M.</b> Espectro de masas del compuesto Linalool de la oleorresina de orégano encontrado en la fracción de hexano	94
<b>ANEXO N.</b> Espectro de masas del compuesto 5, 9, 9-Trimetill-spiro[3.5]non-5-en-1-one de la oleorresina de orégano encontrado en la fracción acetonitrilo.	94

## RESUMEN

En este estudio se realizó la extracción, análisis físico-químicos y microbiológicos a la oleorresina del Orégano. Las extracciones realizadas fueron obtenidas a partir del orégano previamente lavado y deshidratado a 40°C por dos días. El método Soxhlet utilizando como solvente etanol al 75% presentó un mayor porcentaje de rendimiento y buenas características organolépticas en la extracción. Se realizaron pruebas de cenizas, densidad, índice de refracción, índice de acidez, análisis GC-MS, análisis microbiológicos, actividad antioxidante y análisis sensorial; todas las pruebas fueron realizadas por triplicado. Los resultados obtenidos para los análisis microbiológicos fueron satisfactorios presentando negativo para coliformes totales, coliformes fecales E-coli y mesófilos aerobios viables; teniendo en cuenta que este estudio preliminar puede dar paso a otros estudios para la comercialización de esta oleorresina como un producto comestible según la norma ISO 22000. El extracto de orégano tiene poca actividad antioxidante ya que el extracto de orégano presentó un IC<sub>50</sub> a una concentración de 35200 ppm, lo cual se puede concluir que el extracto etanólico no presenta compuestos con potencial antioxidante, y además el control positivo (ácido ascórbico) presenta un IC<sub>50</sub> de 415 ppm. Por GC-MS se obtuvieron los siguientes compuestos en mayor porcentaje: Timol (96.351%), 2,5-ciclohexadieno-1,4-diona, 2-metil-5-(1-metiletil) (1.596%). La oleorresina reportó: 0.266 % de cenizas, densidad de 0.988 g/cm<sup>3</sup>, Índice de refracción 1.345 N<sub>D</sub><sup>24</sup> y 49,00% de grados Brix, Humedad 13.635% m/m, Índice de Acidez 5.028 %m/m ácido oleico.

**PALABRAS CLAVE:** Oleorresina, *Origanum vulgare*, Actividad antioxidante, análisis GC-MS, Timol.

## ABSTRACT

*In this study physicist - chemist realized the extraction, analysis and microbiological to the oleoresin of the Oregano. The realized extractions were obtained from the oregano previously washed and dehydrated to 40°C for two days. The method Soxhlet, using as reliable ethanol to 75 %, presented a major percentage of yield and good characteristics organoleptic in the extraction. There were realized tests of ashes, thickness, index of refraction, index of acidity, analysis GC-MS, microbiological analyses, antirust activity and sensory analysis; all the tests were realized by triplicate. The results obtained for the microbiological analyses were satisfactory presenting negative for coliformes entire, coliformes fecal E-coli and aerobic viable mesophylls; bearing in mind that this preliminary study can pass to other studies for the commercialization of this oleoresin as an eatable product as the norm ISO 22000. The extract of oregano has little antirust activity since the extract of oregano presented an IC50 to a concentration of 35200 ppm, which can conclude that the extract ethanol does not present compounds with antirust potential, and also the positive control (ascorbic acid) presents an IC50 of 415 ppm. By GC/MS compounds were obtained, with major presence of the Timol (96.351%), 2, 5-ciclohexadieno-1, 4-diona, 2-metil-5-(1-metiletil) (1.596%). (The oleoresin brought: 0.266 % of ashes, thickness of 0.988 g/cm<sup>3</sup>, Index of refraction 1.3450 N<sub>D</sub>24 and 49,00 % of grades Brix, humidity 13.635% m/m, Antirust activity, 5.028 %m/m oleic acid).*

**KEY WORDS:** *Oleoresin, Origanum vulgare, Antirust activity, analysis GC-MS, Timol.*



## 1. MARCO TEÓRICO

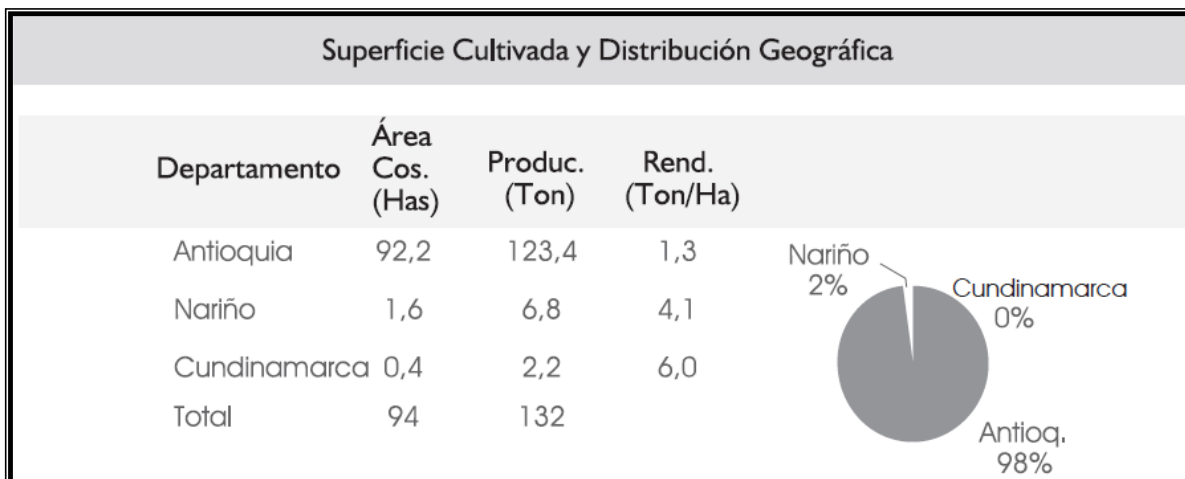
### 1.1 GENERALIDADES DEL OREGANO (*Origanum vulgare*)

Vegetal perteneciente a la familia Labiadacease de hasta 80 cm. Tallos erectos, filosos y aromáticos. Hojas ovales, pecioladas, dentadas o enteras. Flores rosadas, vioáceas o blancas de hasta 7 mm, reunidas en inflorescencias redondeadas terminales. Estambres sobresalientes. En herbazales secos y al lado de los bosques <sup>(1)</sup>.

Su nombre botánico *Origanum vulgare*, que deriva del griego, significa, "esplendor de la montaña". Es una planta originaria de Europa Central, Meridional y Asia Central. Los españoles introdujeron el orégano al país. En la precordillera de África su cultivo lleva más de 200 años. Alrededor de 1970 fue introduciéndose en la zona central, donde posteriormente se cultivó en forma extensiva <sup>(1)</sup>.

La hoja del orégano se usa no solo como condimento de alimentos y conservación del mismo sobre todo en la elaboración de carnes y embutidos <sup>(2)</sup>, sino también en la elaboración de cosméticos, fármacos y licores; motivos que lo han convertido en un producto de exportación. Adicionalmente, la Organización Mundial de la Salud estima que cerca del 80% de la población en el mundo usa extractos vegetales o sus compuestos activos <sup>(3)</sup>.

En Colombia la superficie cultivada y distribución geográfica, del orégano está presente principalmente en los Departamentos de Antioquia, Cundinamarca y Nariño <sup>(4)</sup>, como puede observarse en la **figura 1**.



**Figura 1. Superficie Cultivada y Distribución Geográfica del Cultivo de Orégano en Colombia.**

Además, si se tiene en cuenta una serie de condiciones óptimas de Temperatura, Altitud, pH, Humedad relativa y clima del suelo mostradas a continuación en la **figura 2**; puede obtener un mayor rendimiento de sus componentes <sup>(4)</sup>.

Temperatura Óptima	18 24 °C
Humedad Relativa	70%
PH	Tolera el PH Alcalino.
Altitud	1500 a 3000 msnm
Clima Suelo	Tiene éxito en casi todos los tipos de suelo ricos en materia orgánica y con buen drenaje, de preferencia no salinos; en los suelos arcillosos la longevidad se reduce. Los mayores rendimientos en aceite esencial se obtienen en zonas bien soleadas y cuya altitud no sea excesiva. Crece espontáneamente donde el clima sea entre templado y subtropical, no demasiado seco. Resiste bien las heladas, sobre todo el orégano rojo (la spp. vulgaris) y ambos mucho más resistentes que el O. majorana. (Infoagro)

**Figura 2. Condiciones óptimas para el cultivo del Orégano**

De la participación del orégano en el mercado Nacional no se encontró suficiente información para establecer la estabilidad de precios, sin embargo su consumo en Colombia es aproximadamente 11 toneladas al año. Mientras que en el mercado Internacional se encontró que a partir del año 2000 Perú, Ecuador, Venezuela y

Estados Unidos, comenzaron a ser tanto importantes exportadores como consumidores <sup>(4)</sup>.

Con base en criterios morfológicos, el género *Origanum* se ha clasificado en 3 grupos, 10 secciones, 38 especies, 6 subespecies y 17 híbridos <sup>(5)</sup>.

La composición y la cantidad de los metabolitos secundarios de estas plantas dependen de factores climáticos, la altitud, la época de cosecha, y su estado de crecimiento, datos que se pueden observar en la **tabla 1**. Por lo anterior el estudio de dichos factores y su influencia en su cultivo es importante para un mejor aprovechamiento y explotación <sup>(6)</sup>.

**Tabla 1. Características de varios tipos de orégano.**

Nombre Científico	Nombre Común	Hojas	Altura(cm)	Suelo	Luz solar	Color de las flores
<i>Origanum syriacum</i> <i>Origanum maru</i>	Orégano Sirio	Perennial	30,48 60,96	Bien drenado	Sol	Blanco
<i>Origanum onites</i>	Orégano de Creta	Perennial	5,080		Sol	Blanco
<i>Origanum dictamnus</i>	Dittany de Creta	Tender perennial	30,48 38,10	Bien drenado	Sol	Rosado
<i>Origanum vulgare aureum</i>	Mejorama dorada trepadora	Perennial	7,620 20,32	Bien drenado	Sol	Blanco
<i>Origanum vulgare hirtum</i>	Orégano Griego	Perennial	30,48 45,72	Bien drenado	Sol	Blanco
<i>Origanum laevigatum</i> "Herrensausen"	Orégano Herrenhausen	Perennial	5,080	Bien drenado	Sol	Púrpura
<i>Origanum laevigatum</i> "Hopleys"	Orégano Púrpura	Perennial	30,48 38,10	Bien drenado	Sol	Púrpura
<i>Origanum majoricum</i>	Orégano Italiano	Perennial	30,48 38,10	Húmedo, bien drenado	Sol y sombra	Blanco
<i>Origanum kaliteri</i>	Orégano Kaliteri	Tender perennial	30,48 60,96	Bien drenado	Sol	Blanco
<i>Origanum rotundifolium</i> cv	Orégano hermoso		38,10	Seco a húmedo	Sol	Rosado
<i>Lippia graveolens</i>	Orégano Mexicano	Tender perennial	5,080 7,620	Bien drenado	Sol	Blanco
<i>Origanum majorana</i>	Orégano Siciliano o mejorama dulce	Tender perennial	20,32 25,40	Húmedo, bien drenado	Sol	Blanco

## 1.2 Quimiotaxonomía del género *Origanum*.

Existen diversos estudios sobre la composición química del orégano, usando extractos acuosos y sus aceites esenciales <sup>(7)</sup>. Se han identificado flavonoides como la apigenina y la luteolina, alcoholes alifáticos, compuestos terpénicos y derivados del fenilpropano <sup>(8)</sup>. En *O. vulgare* se han encontrado los ácidos: coumérico, ferúlico, caféico, p-hidroxibenzóico y vainillínico.

Los ácidos ferúlico, caféico, p-hidroxibenzóico y vainillínico están presentes en *O. onites*. La **tabla 2** presenta algunos de los terpenos principales en cada tipo de orégano.

**Tabla 2. Metabolitos secundarios presentes en las especies del género *Origanum*.**

METABOLITOS SECUNDARIOS	ESPECIES	PRINCIPALES COMPONENTES	REFERENCIAS
TERPENOÍDES	<i>O. vulgare</i>	mirreno, $\gamma$ -terpineno, r-cimeno, timol, carvacol, $\beta$ -cariofileno	9
	<i>O. dictamnus</i>	p-cimeno, timoquinona, carvacol	
	<i>O. onites</i>	p-cimeno, timoquinona, carvacol	
	<i>O. glandulosum</i>	p-cimeno, $\gamma$ -terpineno, timol carvacol, 1,8-cineol, linalool, $\beta$ -cariofileno, (Z) b-farneseno, germacreno D, (Z)-nerolidol	
	<i>O. mejorana</i>	terpineol, carvacol, timol	
	<i>O. Hirtum</i>	carvacol, timol	
FLAVONOIDES	<i>O. vulgare</i>	derivados de apigenol, luteolol, kaemferol y diosmetol	9
	<i>O. mejorana</i>	apigenol, luteolol, diosmetol	

Los responsables de las fragancias y las sensaciones de olor-sabor de muchas plantas son los monoterpenoídes. Los compuestos monoterpenicos forman parte de la mayoría de los aceites que se extraen de las flores, hojas y tallos de plantas aromáticas. Comúnmente se presentan como mezclas isoméricas muy complejas y de difícil separación. Estos dependiendo de su estructura pueden ser divididos en grupos llamados monoterpenoídes aciclicos, monociclicos, y biciclicos<sup>(10)</sup>.

### 1.3 Actividad biológica de los componentes del orégano.

#### 1.3.1 Antioxidante

Los antioxidantes son compuestos que disminuyen la extensión de reacciones de oxidación espontáneas del oxígeno atmosférico con sustancias orgánicas

provocando cambios en sus atributos de calidad, de los cuales los principales son la disminución de la vida útil de muchos productos alimenticios, cosméticos y de la industria química.

En el consumo humano, las sustancias antioxidantes comenzaron a popularizarse mundialmente en las últimas décadas a partir de la difusión de los resultados científicos obtenidos en pruebas de compuestos aislados o en los componentes naturales de alimentos y material vegetal animal. Estas evidencias impulsaron la consideración de los antioxidantes en aplicaciones farmacológicas para tratamientos de prevención de enfermedades como el cáncer o la osteoporosis y con efectos favorables para la salud humana en general. En el área de los cosméticos los antioxidantes surgieron como protectores de los productos o con efectos específicos contra el envejecimiento de la piel. Y en los alimentos, los antioxidantes resultan de interés para incrementar la estabilidad de los productos, reduciendo la velocidad de degradación de compuestos por la oxidación y la pérdida de la calidad nutritiva <sup>(11)</sup>.

Las hierbas culinarias y medicinales han demostrado tener propiedades antioxidantes. Las hierbas secas de orégano, salvia, menta, clavo de olor y las hierbas medicinales chinas tienen antioxidantes mayores a 75 milimoles cada 100 gramos <sup>(11)</sup>.

El aceite esencial de *O. vulgare* tiene actividad anti-radical y esta propiedad se le atribuye a los monofenoles carvacrol y timol. Varios investigadores confirman dicho potencial antioxidante en extractos y aceites esenciales de diferentes especies de orégano (*O. vulgare*, *O. compactum*, *O. majorana*) <sup>(12)</sup>.

### **1.3.2 Potencial antimicrobiano**

Existen múltiples estudios sobre la actividad antimicrobiana de los extractos de diferentes tipos de orégano <sup>(5,6)</sup>. Se ha encontrado que los aceites esenciales de

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

Tienen además capacidad antifúngica contra *Cándida albicans*, *C.tropicalis*, *Torulopsis glabrata*, *Aspergillus Níger*, *Geotrichum* y *Rhodotorula*; pero no contra *Pseudomona aeruginosa*.

Dichos resultados se obtuvieron evaluando la actividad antimicrobiana de los componentes en forma aislada y del aceite esencial. Los fenoles, carvacol y timol poseen los niveles más altos de actividad contra microorganismos Gram negativos, excepto para *P. aeruginosa*, siendo el timol más activo; mientras que el y-terpineno y el p-cimeno no mostraron actividad alguna contra las bacterias estudiadas <sup>(13)</sup>.

### **1.3.3 Las oleorresinas**

Las oleorresinas son mezclas homogéneas de resinas y aceites esenciales, que se obtienen a partir de especias y otros vegetales (plantas aromáticas), obtenidos mediante el uso de solventes, los cuales deben estar libres de los solventes orgánicos de extracción.

Por tal razón, se utilizan extensamente para la sustitución de especias de uso alimenticio y farmacéutico por sus ventajas (estabilidad, uniformidad química e inocuidad microbiológica, facilidad de incorporar al producto terminado). Están constituidas en general por una mezcla entre resinas (principios aromatizantes no volátiles, aceites grasos, ingredientes picantes) y aceite esencial, el cual contiene principios odoríferos volátiles. Las proporciones en la mezcla dependen fuertemente de la técnica de extracción y el órgano, tejido o fruto de la planta donde se obtengan <sup>(14)</sup>.

Cuando se realiza la extracción, se debe seleccionar un solvente, generalmente de punto de ebullición bajo, lo cual permite eliminarlo en forma sencilla.

Son varias las ventajas que poseen las oleorresinas frente a vegetales crudos, cuando se utilizan en alimentos <sup>(15)</sup>:

- ✓ Económicamente es rentable ya que se sustituye sobradamente al vegetal, en cuanto a características de olor y/o sabor.
- ✓ Son uniformes en sus características.
- ✓ Presentan una alta pureza.
- ✓ La inocuidad del producto es confiable.

Las especias naturales así como la tecnología aplicada para la extracción, cumplen un papel esencial para la obtención de los extractos de especias. El contenido de los aceites esenciales, es el único criterio de aplicación general para el análisis de dichos extractos, los cuales se obtienen por medio de una destilación continua de vapor de agua <sup>(15)</sup>.

La resolución 4241 de 1991 del ministerio de salud pública colombiana <sup>(16)</sup>, define las características de las especias o condimentos vegetales, contemplando que las oleorresinas solo pueden ser extraídas de la especia con solventes grado alimenticio, tales como el hexano y el dicloro-etileno.

- Condiciones microbiológicas:

En general, en la **tabla 3** se pueden observar las condiciones microbiológicas que deben cumplir las especias y los productos hechos a base de ellas:



**Tabla 3. Parámetros microbiológicos de las especias y sus derivados.**

	<b>N</b>	<b>M</b>	<b>M</b>	<b>C</b>
<b>NMP coliformes fecales</b>	3	4	40	1
<b>Esporaz clostridium sulfito reductor/g.</b>	3	100	1000	1
<b>B. cereus/g</b>	3	100	1000	1
<b>Hongos y levaduras</b>	3	3000	5000	1

Las convenciones utilizadas son:

n= Número de muestras a examinar.

m= índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad.

M= índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad.

C= Número máximo de muestras permisibles con resultados entre m y M.

- Condiciones organolépticas: Las propias de cada especie o de sus mezclas.
- Genuinidad: En las especias puras y productos hechos a base de ellas, deberán identificarse los elementos histológicos característicos de una de ellas.

## **1.4 METODOLOGÍAS DE ANÁLISIS**

La amplia utilización de extractos, aceites esenciales y oleorresinas provenientes de diversas fuentes, en algunas industrias como es el caso de la alimentaria, exige que dichos materiales sean caracterizados, para concluir sobre aspectos como su identidad, composición (pureza, autenticidad) y calidad (frescura, vida útil) <sup>(17)</sup>.

### **1.4.1 Análisis Físico-químicos**

- **Porcentaje de humedad:** El agua es el único ingrediente de los alimentos que está prácticamente presente en todos ellos y su cantidad, estado físico y dispersión afectan el aspecto, olor, sabor y textura.

Esta relación reviste gran importancia en la conservación de los materiales alimenticios y por tanto en la protección de su calidad <sup>(18)</sup>.

- **Cenizas:** son el residuo de la incineración, bajo ciertas condiciones, de todo el contenido de material orgánico en la muestra. La combustión es completa y el residuo corresponde al contenido total en minerales. Las cenizas normalmente no son las mismas sustancias inorgánicas presentes en la muestra original, debido a las pérdidas por volatilización o a las interacciones químicas entre los constituyentes. Se expresa en %, (m/m) <sup>(17,19)</sup>.
- **Densidad:** La densidad de una sustancia es el peso de un mililitro de la misma. Se obtiene dividiendo el peso de cierto volumen de sustancia entre el peso del volumen similar de agua. El resultado depende de la temperatura. Normalmente, la densidad se determina a 20 °C <sup>(18)</sup>.
- **Índice de refracción ( $n_D^t$ ):** Se define como el cociente entre el seno del ángulo de incidencia y el seno del ángulo de refracción de la luz monocromática al pasar del aire a un medio ópticamente más denso. Generalmente se mide a 20, 25 o 40 grados centígrados, tomando como referencia la línea D del sodio (589 nm). Su utilidad radica en casos como la identificación y caracterización de líquidos puros, grasas y aceites, comprobación de la pureza de diversos alimentos, determinación del contenido de agua en miel o en extractos de alimentos ricos en sacarosa (confituras, miel, jarabe de almidón, zumos, etc.). Se denota  $n_D^t$  <sup>(17,19)</sup>.
- **Índice de Acidez:** Es la medida del contenido de sustancias con carácter ácido en una matriz determinada. Su utilidad radica en que sirve como indicativo de pureza y en ocasiones se puede concluir a partir de este resultado el nivel de degradación o tratamiento de la muestra. La acidez se puede expresar como los mg de KOH que son necesarios para neutralizar los ácidos presentes (minerales, ácidos grasos u orgánicos) o como la cantidad de ácido oleico en la muestra <sup>(17)</sup>.

### 1.4.2 Análisis microbiológicos

En la industria alimentaria, los microorganismos (especialmente las bacterias) se constituyen en uno de los más importantes problemas a enfrentar, ya que la inocuidad del alimento es necesaria para un consumo seguro <sup>(20)</sup>.

Las determinaciones más generales realizadas en alimentos son:

- ✓ **Mesófilos aerobios viables:** Dentro de este grupo se incluyen todas las bacterias, mohos y levaduras, que se desarrollan a 30° centígrados y debido a que esta temperatura es óptima para muchas formas de vida libre, están muy difundidos en el medio ambiente, la mayoría de estos microorganismos se encuentran en todos los productos.

Un recuento bajo no asegura ni implica la ausencia de patógenos o sus toxinas, así mismo un recuento alto no implica la presencia de flora patógena, sin embargo puede significar la contaminación de la materia prima o del producto en proceso, la inmediata alteración del producto o la presencia de mesófilos patógenos<sup>(20)</sup>.

- ✓ **Mohos y Levaduras:** Los hongos, además de las bacterias, son causantes de la descomposición y putrefacción de la materia orgánica. Se reproducen generalmente por esporas, son acompañantes muy comunes de toda forma de vida, en algunas ocasiones como parásitos patógenos <sup>(20)</sup>.

Las levaduras son a menudo difíciles de reconocer, pueden tener efectos beneficiosos y perjudiciales se desarrollan mejor en medios abundantes en agua y en condiciones aerobias. Ambos, hongos y levaduras crecen en un rango óptimo de temperatura entre los 25 – 30°C y un máximo entre los 35 – 47 °C y un pH próximo a 4 – 4.5 <sup>(20)</sup>.

- ✓ **Coliformes totales:** son un grupo constituido por bacilos aerobios estrictos o aerobios facultativos, Gram-negativos no esporulados, que tiene la

capacidad de fermentar lactosa con formación de gas. Los generos que se incluyen en este grupo son: Escherichia, Aerobacter, Klebsiella, Enterobacter y Paracolobactrum. Su recuento es importante ya que las bacterias Coliformes son perjudiciales al organismo, y su presencia se considera como signo de mala calidad de la higiene de los procesos o los manipuladores y/o contaminación cruzada. Su crecimiento inutiliza los alimentos <sup>(20)</sup>.

- ✓ **Coliformes fecales (E-coli):** se considera en este grupo al bacilo de la especie Escherichia coli; es Gram-negativo, con temperatura optima de crecimiento de 37°C (existe multiplicación entre 10°C y 40°C), y pH optimo de 7 - 7.5 (soportando pH del rango de 4 a 8.5). Su presencia en alimentos indica una contaminación de origen fecal. También pertenecen a este grupo la *Salmonella* y la *Shiguella* <sup>(20)</sup>.

## 1.5 Métodos de extracción

### 1.5.1 Extracción Soxhlet

Consiste en un método de extracción sólido- líquido, que se utiliza generalmente para aislar los componentes lipídicos de una muestra por medio de un solvente.

### 1.5.2 Extracción por maceración pasiva

Consiste en un método de extracción sólido-liquido, en el que ambas fases (sólida y líquida) se encuentran en un contacto directo, por lo que los componentes del sólido que son afines al solvente quedaran disueltos en el mismo.

Las respectivas ventajas y desventajas de ambos métodos de extracción se encuentran enunciadas en la **tabla 4**.

**Tabla 4. Ventajas y desventajas de los métodos de extracción (Soxhlet, maceración pasiva)**

<b>MÉTODOS DE EXTRACCIÓN</b>	<b>VENTAJAS</b>	<b>DESVENTAJAS</b>
<b>EXTRACCIÓN SOXHLET</b>	El disolvente y la muestra están en contacto íntimo y repetido. De manera que se mejora muchísimo la extracción porque siempre se emplea un disolvente limpio <sup>(21)</sup> .	No aplicable a alimentos que contengan grasas recubiertas (productos lácteos) <sup>(21)</sup> .
	El disolvente proviene de una condensación luego es líquido y está caliente. Favorece la solubilidad del analito <sup>(21)</sup> .	Es un proceso extremadamente lento e imposible de acelerar
	No se requiere filtración posterior. El disolvente orgánico se evapora quedando sólo analito <sup>(21)</sup> .	Se requiere gran cantidad de disolvente <sup>(21)</sup> .
	Gran capacidad de recuperación <sup>(21)</sup> .	Inaplicable a analitos termolábiles, que se descompongan con el calor o reaccionen <sup>(21)</sup> .
	Instrumentación simple <sup>(21)</sup> .	Necesidad de etapa final de evaporación <sup>(21)</sup> .
<b>EXTRACCIÓN POR MACERACIÓN PASIVA</b>	Método de extracción directa aplicable a alimentos en general <sup>(22)</sup> .	Se requiere gran cantidad de disolvente <sup>(22)</sup> .
	El proceso se realiza a temperatura ambiente, por tanto no hay degradación de compuestos <sup>(22)</sup> .	Necesidad de etapa final de evaporación <sup>(22)</sup> .
	Se puede realizar con agitación magnética o sin esta <sup>(22)</sup> .	
	Se logra extraer todas las propiedades de lo que se macera <sup>(22)</sup> .	

## 1.6 Análisis instrumental

### 1.6.1 Métodos de separación Cromatográfica.

Los procedimientos cromatográficos en general, son procesos de separación que consisten en obligar a la sustancia problema a sufrir una migración diferencial entre dos fases: fase móvil y fase estacionaria. Durante la separación, la fase móvil atraviesa la fase estacionaria. La fase estacionaria es un sólido (adsorbente o sorbente) o un líquido. La fase móvil es un gas insoluble o un líquido inmiscible con la fase estacionaria. Existe también una nueva variante denominada gas supercrítico (fluido) <sup>(23)</sup>.

Los procedimientos cromatograficos se clasifican de acuerdo a los siguientes principios:

- Según la constitución física del soporte.
  - Según la combinación de los diferentes tipos de fases.
  - Según el tipo de separación.
- **Cromatografía de gases GC:** se constituye en un procedimiento de separación para los compuestos volátiles, los cuales fluyen en una corriente gaseosa sobre o a través de una fase estacionaria fijada en el interior de un tubo largo y fino, la cual puede ser un sólido adsorbente de empaquetamiento, o un líquido viscoso no volátil que recubre las paredes internas de la columna. El gas portador es un gas inerte (nitrógeno, helio, hidrógeno, argón) y transporta una muestra respectiva de la sustancia inyectada. Los diversos componentes son retenidos o retrasados por la fase estacionaria con mayor o menor fuerza, y alcanzan correspondientemente el final de la columna donde se encuentra el detector. Los tiempos de flujo del gas portador son relativamente largos.

La GC permite realizar tantos análisis cualitativos, como cuantitativos de sustancias que se volatilizan a temperaturas elevadas sin degradarse, o de los cuales se obtienen derivados volátiles reproducibles. La elección del modo de inyección de la muestra, la temperatura de la columna y el tipo de detector, determinan los resultados del procedimiento <sup>(24)</sup>.

- **Espectrometría de masas MS:** es una de las herramientas analíticas de mayor aplicación, ya que es capaz de proporcionar información acerca de la composición elemental de las muestras, estructura de las moléculas orgánicas, inorgánicas y biológicas, composición cualitativa y cuantitativa de las muestras complejas, estructura y composición de superficies sólidas, y relaciones isotópicas de las muestras, etc.

En forma general, la MS consiste en introducir una cantidad de muestras (igual o inferior a un micromol) por medio de un sistema de entrada, donde los componentes se convierten en uniones gaseosas (muestras sólidas o líquidas),

en un proceso llamado volatilización. Por medio de una fuente de iones, los átomos se convierten en iones, normalmente positivos acelerados hacia el interior del analizador de masas. El analizador de masas mide la relación masa/carga de los iones del analito, así mismo el detector convierte al haz de iones en una señal eléctrica que puede ser procesada y almacenada en la memoria de un ordenador, mostrada o registrada de diferentes maneras <sup>(24)</sup>.

- **Cromatografía de gases - Espectrometría de masas GC-MS:** Una de las mejores herramientas para el análisis de mezclas orgánicas y bioquímicas complejas es la cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC - MS), método de análisis acoplado en el cual se toma el espectro de masas de cada uno de los compuestos que salen de la columna cromatográfica; siendo estos guardados en un ordenador para su subsiguiente procesado. Así mismo, la espectrometría de masas se puede acoplar a la cromatografía líquida para el análisis de muestras que contienen componentes no volátiles. Es importante el desarrollo de métodos para la eliminación del eluyente antes de la introducción de la muestra en el espectrómetro de masas, ya que la muestra está muy diluida por el líquido o el gas portador en el interior de la columna <sup>(24)</sup>.

## 1.7 Identificación del problema

Teniendo en cuenta lo mencionado ¿Es posible que la oleorresina obtenida de *Origanum vulgare* pueda dar valor agregado a dicho cultivo para que pueda ser explotado agroindustrialmente?



## **1.8 Objetivos**

### **1.8.1 Objetivo general**

- Caracterizar la oleorresina del orégano (*Origanum vulgare*).

### **1.8.2 Objetivos específicos**

- Establecer una metodología eficaz de extracción para la oleorresina del orégano (*Origanum vulgare*).
- Evaluar las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas de la oleorresina obtenida para que su comportamiento sea conforme con la normatividad vigente para alimentos.

## 1.9 Justificación

En Colombia, el comercio de oleorresinas no ha tenido una alta explotación a pesar de contar con una gran gama de productos agrícolas, de los cuales se podría tener un mejor aprovechamiento <sup>(25)</sup>.

Como en nuestro país el comercio de las especias es poco tecnificado ya que estas se consumen casi en la totalidad en forma molida o sin ningún tratamiento previo, como es el caso del orégano, se crea la importancia de extraer y caracterizar este producto que podría tener grandes intereses comerciales debido a que a partir de 1960 el mercado ha evolucionado ampliamente dándoles mayor uso y aumentando una fuerte demanda en países como Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, Alemania, Francia, y Japón <sup>(15)</sup>.

El cultivo del orégano tiene éxito en todos los tipos de terreno ricos en materia orgánica, sueltos, silíceos arcillosos, francos, humíferos, calcáneos, arcilloso - arenosos e incluso en lugares áridos.

Actualmente la demanda del orégano (*Origanum vulgare*) se encuentra en alza, captando el interés de pequeños y medianos productores, como una alternativa económico - productiva a tenerse en cuenta. Son cultivos versátiles que se adaptan a modalidades de mercado cambiantes por sus diversos usos, ya sea como hierbas secas, aceites esenciales, etc.

El Orégano es una especie de alta adaptabilidad a gran variedad de suelos y climas, lográndose cosechas de buena rentabilidad, tanto en deshidratados como en aceites esenciales <sup>(26)</sup>.

Teniendo en cuenta estos aspectos se observa la necesidad de realizar un mejor aprovechamiento a la cantidad que se produce nacionalmente mediante la extracción de su oleorresina, ya que este tipo de derivados presenta una serie de ventajas frente a los vegetales crudos que se consumen a diario: <sup>(27)</sup>.

- ✓ Son uniformes en sus características.
- ✓ Son naturales ya que no poseen rastros de solventes o trazas de pesticidas.
- ✓ Presentan una alta pureza.
- ✓ Exentos de materias y enzimas.
- ✓ Alta uniformidad en su composición.
- ✓ Gran rendimiento económico, sustituyendo hasta 100 Kg de producto en polvo por 1 a 2 Kg de oleoresina.

De aquí la pertinencia e importancia de extraer y caracterizar este producto ya que su éxito radica en la importancia para la industria alimentaría durante los últimos años, aumentado la fabricación de productos cárnicos y platos preparados, con lo cual, las oleoresinas o extractos de especias han alcanzado cada vez más relevancia comercial debido a una fuerte demanda que se ve gratificada con un gran rendimiento del producto <sup>(26,28)</sup>.

En el eje cafetero se ha planeado la deshidratación de plantas aromáticas y medicinales obteniendo al final del proceso los productos empacados y distribuidos comercialmente para uso culinario, los cuales han sido cultivados ecológicamente. Las plantas aromáticas y medicinales seleccionadas para el desarrollo del negocio debido a sus enormes posibilidades de mercado y a la existencia de cultivos son:

- ✓ Albahaca (*Ocimum basilicum*)
- ✓ Laurel (*Laurus nobilis*)
- ✓ Romero (*Rosmarinus officinalis*)
- ✓ Tomillo (*Thymus vulgaris*)
- ✓ Orégano (*Origanum vulgare*)
- ✓ Mejorana (*Origanum majorana*)

El grupo de Oleoquímica de la Universidad Tecnológica de Pereira ha llevado a cabo la obtención y caracterización de Oleorresinas de Ajo (*Allium sativum*), Pimentón Rojo (*Capsicum annuum l*) y Berenjena (*Solanum melongena l*)<sup>(29)</sup>; obteniendo productos que guardan consistencia con reportes bibliográficos garantizando un poder condimentante uniforme, adecuadas propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y una fuerte esencia característica de cada planta (20,29).

## 2. SECCION EXPERIMENTAL

### 2.1 Materiales y métodos

#### 2.1.1 Materiales

##### 2.1.1.1 Solventes empleados <sup>(29)</sup>

Para las extracciones realizadas se emplearon varios solventes, los cuales se pueden observar en la **tabla 5**.

**Tabla 5. Solventes empleados para las extracciones Soxhlet, maceración pasiva**

SOLVENTE	MARCA	GRADO DE PUREZA (%)	CANTIDAD EMPLEADA (mL)
<i>ETANOL</i>	Merck	99.9	250
<i>HEXANO</i>	Mallinckrodt	98.5	250
<i>MEZCLA MONOFÁSICA ETANOL- HEXANO (1:1)</i>		95	125

##### 2.1.1.2 Condiciones instrumentales generales

Las condiciones instrumentales generales para el desarrollo de los diferentes análisis se pueden observar en la **tabla 6**.

**Tabla 6. Condiciones instrumentales generales**

<b>CONDICIONES INSTRUMENTALES GENERALES</b>	<b>MARCA - REFERENCIA</b>
<b><i>Agitador magnético</i></b>	Agitador magnético MOD. PC – 310 CORNING
<b><i>Balanza analítica</i></b>	Balanza analítica ADVENTURE 2010 GR
<b><i>Cromatógrafo</i></b>	Shimadzu, Modelo GC-MS QP 2010
<b><i>Estufa</i></b>	Estufa horno WT Binder CAP 115L
<b><i>Mufla</i></b>	Horno mufla digital programable Ney Company
<b><i>Refractómetro</i></b>	FISHER ABBE 3L
<b><i>Rotaevaporador</i></b>	HEIDOLPH. Marca Laborota 4003
<b><i>Fotómetro</i></b>	Espectrofotómetro Genesys 20R/4001 Ref. 14385-445
<b>Manta de calentamiento</b>	Manta de calentamiento para matraz de 100mL Modelo CMFM 1000/X1 Ref. 11474-50

### **2.1.1.3 Material vegetal**

#### **2.1.1.3.1 Aspectos agroecológicos del cultivo**

La muestra que representó la población colombiana de *Origanum vulgare*, consiste en hojas recolectadas en la vereda el Cedralito del municipio de Santa Rosa de Cabal.

El cultivo de orégano que se empleó para el análisis como se puede apreciar en la **figura 3**, es nativo de clima frío, ubicado a una altura de 1921 m sobre el nivel del mar cuyas coordenadas son: Norte 04° 46´ 50´´ al Oeste.



**Figura 3. Cultivo del Orégano de la vereda el Cedralito-Santa Rosa de Cabal**

El cultivo de orégano es fumigado cada 15 ó 20 días con Laconil 720 y Amistar (fungicidas catalogados por su baja toxicidad), y una mezcla bio-preparada (ají, salvia, ajo, cebolla cabezona, hoja de cabuya y altamisa) que ayuda a controlar plagas propias del cultivo como el Chinche y las Goteras.

#### **2.1.1.3.2 Obtención del material vegetal**

El *Origanum vulgare* que será objeto de estudio se colectó en la vereda el Cedralito del municipio de Santa Rosa de Cabal. Estas plantas fueron recolectadas a las 7 am de un cultivo de 5 meses de edad.

## **2.2 Metodología**

### **2.2.1 Sitio de realización del trabajo**

Se ubicaron las plantas de *Origanum vulgare* en la vereda el Cedralito del municipio de Santa Rosa de Cabal. Se colectaron y se llevaron hasta las instalaciones de la Escuela de Tecnología Química (laboratorio de Oleoquímica) de la UTP cuyas condiciones son:

- Temperatura: 23°C.
- Humedad relativa: 73%.
- Presión atmosférica: 645 mm Hg.

### 2.2.2 Tratamiento y acondicionamiento de la muestra

El proceso del tratamiento y acondicionamiento del orégano puede observarse en la **figura 8**, en la cual se observa un esquema básico.

Las plantas colectadas de *Origanum vulgare* fueron lavadas con agua para eliminar cantidades de tierra que puedan contener, pero teniendo en cuenta que el lavado no debe ser excesivo, porque algunos nutrientes solubles podrían perderse. Después del proceso de lavado se hizo una selección de hojas como puede apreciarse en la **figura 4** (escoger las que se encuentren en buen estado, sin hongos).



**Figura 4. Selección del material vegetal, que será objeto de estudio**

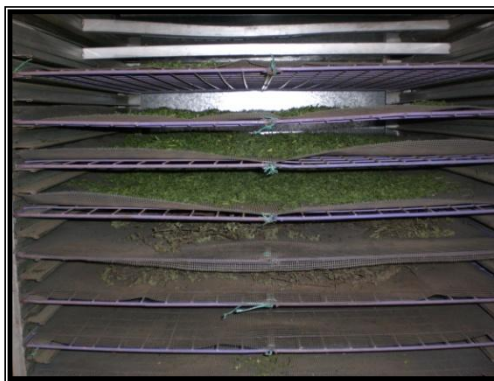
Posterior a estos procesos se realizó una de desinfección para mejorar la calidad microbiológica, ya que el material vegetal puede tener contaminación por polvo, residuos de fumigación, excrementos de animales, malas condiciones de almacenamiento, transporte ó manipulación, y tal situación podría afectar los resultados obtenidos.



Para el proceso de desinfección, el material vegetal previamente lavado se colocó en un recipiente limpio con una solución de hipoclorito de sodio que tiene un aporte de cloro disponible como  $\text{Cl}_2$  de 40 ppm por un tiempo de contacto de aproximadamente 5 minutos <sup>(30,31, 32)</sup> proceso que se puede apreciar en la **figura 5**. Después de dicho tiempo, se eliminó la solución clorada y se lavó el material vegetal con abundante agua destilada para eliminar los residuos de  $\text{Cl}_2$ ; posterior a dichos procesos se llevó el material vegetal a una estufa como se observa en la **figura 6** donde se realiza un secado por un período de dos días a una temperatura de bulbo seco de  $40^\circ\text{C}$  <sup>(4)</sup> previniendo así la volatilización de aceites de bajo peso molecular.



**Figura 5. Proceso de desinfección del Orégano.**



**Figura 6.** Secado del Orégano en la estufa.

Después del proceso de lavado, el material vegetal se redujo a partes más pequeñas por medio de un proceso de picado a mano como puede verse en la **figura 7**, dicho proceso se realizó para evitar que al utilizar instrumentos metálicos (tijeras, cuchillo, picadora), por que cuando se desee extraer principios volátiles o muy termosensibles se debe tener en cuenta que el calentamiento que producen los elementos metálicos durante el fraccionamiento puede disminuir el rendimiento del principio de interés por volatilización descomposición <sup>(33)</sup>.



**Figura 7.** Picado del Orégano.

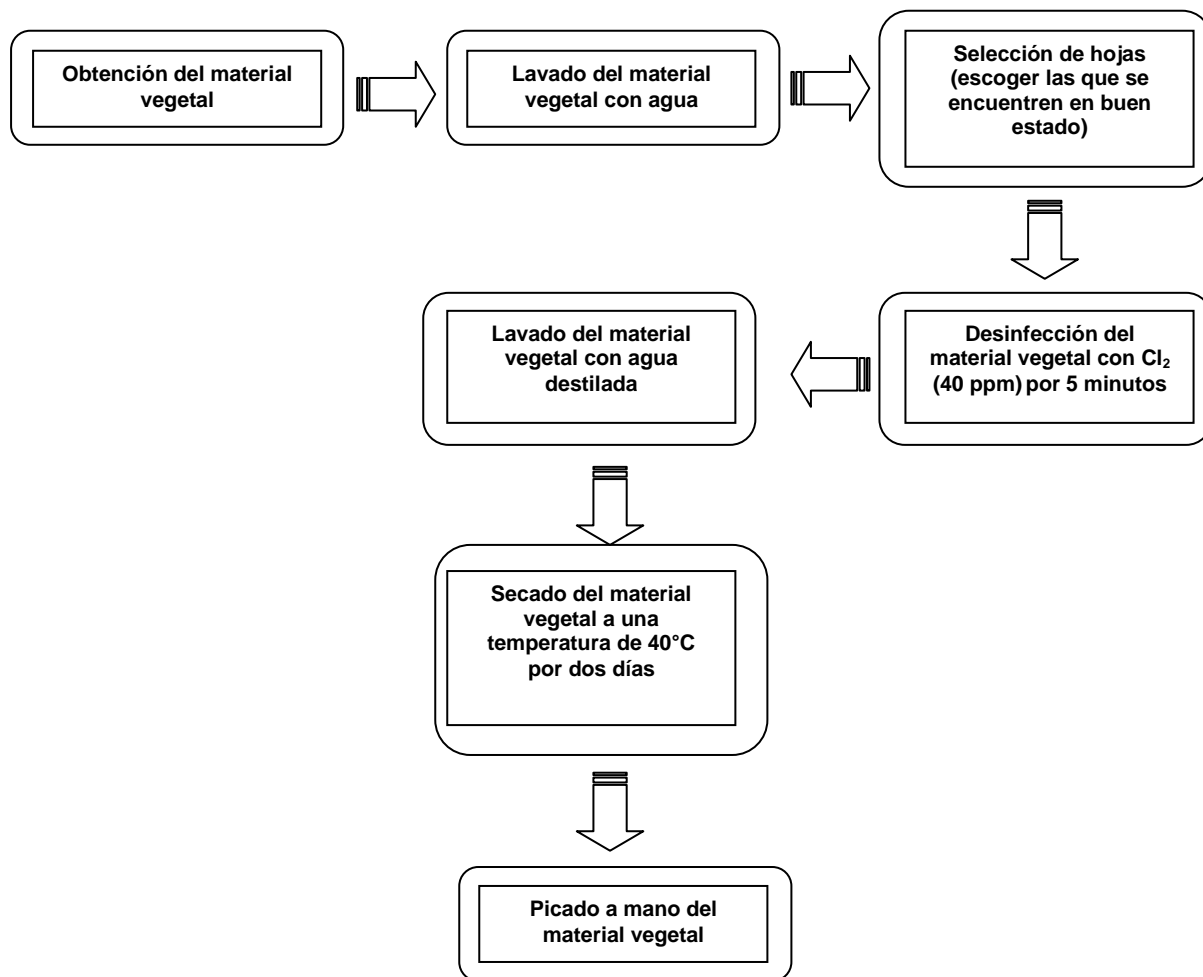


Figura 8. Esquema del acondicionamiento y tratamiento de la muestra de Orégano.

### 2.3 Obtención de la oleorresina de orégano

Buscando el máximo aprovechamiento de los solventes, se llevaron a cabo dos procesos de extracción que permitieron obtener oleorresinas con diferentes características.

### **2.3.1 Proceso de Extracción Soxhlet:**

Se extrajeron 25 g de material vegetal seco y picado de *Origanum vulgare* por el método sólido-liquido Soxhlet y para ello la muestra fue envuelta en un filtro para café y dispuesta dentro de un extractor con 250 mL del solvente que se vaya a emplear (etanol 75%, hexano y mezcla etanol absoluto-hexano absoluto en proporción 1:1 v/v).

### **2.3.2 Proceso de extracción por maceración pasiva:**

Se extrajeron 25 g de material vegetal seco y picado de *Origanum vulgare* por el método de maceración pasiva, el cual requiere agitación magnética y para ello la muestra fue dispuesta dentro de un beaker de 1000 ml con 250 mL del solvente a emplear (etanol 75%, hexano y mezcla etanol absoluto-hexano absoluto en proporción 1:1 v/v).

Los procesos de extracción se realizaron por triplicado con un tiempo de dos horas cada uno, conjugando la presentación del Orégano, los tres tipos del solvente y los dos métodos de extracción.

- **Condiciones de almacenamiento**

Una vez obtenida la oleorresina fue, preciso evitar la degradación por efecto de la luz, absorción de humedad, evaporación de constituyentes volátiles, oxidación debida al aire y cambios debido a la acción de microorganismos <sup>(18)</sup>. Para ello es necesario depositar la oleorresina en frascos de vidrio tapa rosca color ámbar y situarla en un ambiente fresco (temperatura ambiente).

### **2.3.3 Análisis Organoléptico**

Este análisis constituye una disciplina científica que permitió evaluar, medir, analizar e interpretar las características organolépticas de la oleorresina (color, olor, sabor, aspecto y aspecto) mediante uno ó más órganos de los sentidos humanos <sup>(18)</sup>.

## **2.4 Análisis fisicoquímicos y microbiológicos de la oleorresina**

### **2.4.1 Determinaciones fisicoquímicas**

#### **2.4.1.1 Humedad del material vegetal**

Para su determinación se aplicó un sistema de deshidratación completa por evaporación con aire caliente, a una temperatura igual o superior a la evaporación del agua pura, la cual fue 130°C por un tiempo de dos horas <sup>(29)</sup>.

#### **2.4.1.2 Humedad de la oleorresina**

Se utilizó el método gravimétrico, midiendo la masa del residuo remanente de someter al calor seco de una estufa a 110°C por aproximadamente 2 horas, una masa pesada de la muestra en una cápsula de porcelana previamente tarada, y posteriormente la determinación del % de mineral seco <sup>(18)</sup>.

#### **2.4.1.3 Cenizas**

Se aplicó un sistema de calcinación controlada en una mufla, la cual tenía una temperatura de 550°C. Para ello se utilizó un crisol previamente tarado el cual después del proceso de calcinación fue depositado en un desecador, y posterior a este se realizó su pesado para la determinación del porcentaje de mineral que pueda contener la oleorresina <sup>(18)</sup>.

#### **2.4.1.4 Densidad**

Se determino por triplicado a una temperatura de 23°C según la norma ICONTEC 432 reportando los resultados en g/mL <sup>(34)</sup>.

#### **2.4.1.5 Índice de refracción**

Se determinó según la Norma Colombiana ICONTEC 289 utilizando para ello un refractómetro de tipo Fisher Abbe 3L a una temperatura de 24°C <sup>(35)</sup>.

#### **2.4.1.6 Índice de acidez**

Se realizo según la Norma Colombiana ICONTEC 218, expresando el resultado final como % de acido oleico <sup>(36)</sup>.

#### **2.4.1.7 Actividad antioxidante**

En este ensayo, se avalúa la capacidad que tiene un posible antioxidante para neutralizar un radical. El compuesto 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) es un radical estable que presenta una intensa coloración violeta y que absorbe radiación a una longitud de onda de 517nm, de forma que su concentración se puede determinar mediante métodos espectrofotométricos. En el ensayo se determina la concentración inicial de DPPH y la concentración resultante una vez se ha añadido el posible antioxidante (oleorresina), de forma que una disminución de la absorción de radiación se traduce en una disminución de la concentración de DPPH debida a la cesión de electrones de la especia antioxidante.

Se prepararon diluciones de las oleorresinas con metanol de 100, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 ppm; posteriormente se toman 30 µL de cada dilución y se le adicionan 3 mL de DPPH, Se deja en la oscuridad por 30 minutos; los ensayos se

realizaron por triplicado. Se debe de medir la Absorbancia del DPPH y de las diluciones a 517nm<sup>(37)</sup>.

Los resultados de la actividad antioxidante son expresados en µeq de DPPH/g de extracto o fracción seco<sup>(37)</sup>.

## **2.4.2 Caracterización Química**

### **2.4.2.1 Análisis por GC- MS**

#### **2.4.2.2 Preparación de la muestra**

Para el posterior análisis de la oleorresina se tomó una porción de esta (alrededor de 10 mL), con la cual se realizaron extracciones sucesivas liquido-liquido con hexano y acetonitrilo (alrededor de 25 mL) para separar los compuestos de baja polaridad y compuestos de alta polaridad que pudiera contener la oleorresina<sup>(38)</sup>.

Al finalizar dicho proceso de extracción se eliminaron los solventes por medio de un proceso de rotaevaporación<sup>(20,27)</sup>, y se seco cualquier cantidad de agua que pudiera contener el extracto adicionando sulfato de sodio anhidro; posterior a los procesos anteriores con dicha muestra se realizó el análisis por GC-MS.

#### **2.4.2.3 Condiciones de análisis**

Para los análisis por cromatografía de gases acoplada a masa (GC-MS) de las muestras de las Oleorresinas obtenidas por los dos tipos de análisis se establecieron las siguientes condiciones operacionales:

**EQUIPO:** Marca: Shimadzu, Modelo: GC-MS QP 2010

**Detector:** Espectrómetro de masas.

Temperatura fuente de Iones: 260°C.

Voltaje de Ionización: 70 eV.

**Ganancia en detector:** 0,3 kV.

Modo de adquisición: SCAN.

Rango de masas: 50-70 m/z.

**Columna:**

Capilar MXT 5 silMS.

Longitud: 30 m.

Diámetro interno: 0,25 mm.

Temperatura inicial del horno de la columna: 35°C/5 min.

Rata de cambio de Temperatura en el horno: 10°C/min.

Temperatura final del horno de la columna: 280°C/5 min.

**Espesor de película:** 0,25 µm.

Presión de entrada a la columna: 73 KPa.

**Flujo total:** 9.1 mL/min.

**Inyector: Automático:** AOC20I Shimadzu.

Split Ratio: 100.0.

Temperatura: 250°C.

**Modo de ionización:** Impacto electrónico (70ev).

**Tiempo de análisis:** 34 min.

**Volumen de Inyección:** 2 µL.

**Gases:**

Carrier: Helio (99.995%).



### 2.4.3 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

El análisis microbiológico se realizó para identificar y cuantificar los microorganismos presentes en la oleoresina; para ello después del proceso de rotaevaporación se tomo 10 mL de la oleoresina obtenida y se añadió 90mL de solución salina que tiene una concentración de 80%, y a partir de esta primera dilución ( $10^{-1}$ ) se procedió a preparar las otras tres diluciones ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ) para los correspondientes análisis <sup>(20)</sup>.

**2.4.3.1 Determinación de Mesófilos aerobios viables:** Para su determinación se utilizó el método estándar de recuento en placa y siembra por profundidad empleando como medio de cultivo el Agar Nutritivo Standard Plate Count (APHA). Para la siembra se tomo 1ml de cada una de las diluciones ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ), se vertió en el fondo de la caja de petri y se adicono sobre este el agar que esta a una temperatura de 35°C; posteriormente se mezcló cada una de las cajas en forma de 8. Al enfriarse el medio se incubó las cajas en una estufa a una temperatura de 37°C por un tiempo de 24 horas (incluyendo el control del medio) <sup>(20)</sup>.

**2.4.3.2 Determinación de Mohos y Levaduras:** Para su determinación se utilizó el método estándar de recuento en placa y siembra por superficie empleando como medio de cultivo el Agar extracto de levadura-glucosa-cloranfenicol (YGC). Se elaboro el agar y se dejo enfriando hasta su solidificación, luego se tomó 0.1 ml de cada dilución ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ) y se extendió sobre la superficie por medio de una varilla de jockey (rastrillo), posterior a este proceso se incubaron las cajas en una estufa a una temperatura ambiente de 24°C por un tiempo de 8 días (incluyendo el control del medio) <sup>(20)</sup>.

#### 2.4.3.3 Determinación de Coliformes totales

- **Prueba presuntiva:** Para su determinación se empleo el Agar Caldo Allaurilsulfato con MUG, y para ello se preparo el medio y se deposito en tubos de ensayo tapa rosca en cuyo interior se dispuso una campana invertida, luego se adiciono 1ml de cada una de las diluciones ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ) y los tubos se incubaron en una estufa a una temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  por un tiempo de 24 horas (incluyendo el control del medio y un control positivo) <sup>(20)</sup>.
- **Prueba confirmativa:** Esta prueba se realiza cuando el resultado de la prueba presuntiva da un valor positivo al observarse una acumulación de gas en la campana que se encuentra invertida. Para ello se tomó 0,1 ml del tubo tapa rosca y se sembró por superficie sobre el agar Eosina Azul de Metileno (EMB), incubándose a una temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  por un tiempo de 24 horas <sup>(20)</sup>.

**2.4.3.4 Determinación de Coliformes Fecales:** Esta prueba se realizó observando los tubos de la prueba presuntiva de coliformes totales a la luz UV <sup>(20)</sup>.

#### 2.5 Estabilidad

Los análisis microbiológicos se realizaron a los 10 días de haber sido extraída la oleorresina. Pero a esta no se le realizó un proceso de estabilidad microbiológica lo cual deja un gran interrogante sobre si la inocuidad de la oleorresina se conservara por periodos prolongados de tiempo.

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **3.1 Extracción de la oleorresina**

Se llevo a cabo la extracción de la oleorresina empleando los dos métodos de extracción: Soxhlet y en frío; utilizando el Orégano seco y húmedo; y los tres tipos de solventes: etanol 75%, hexano y la mezcla de etanol 95% - hexano (1:1). Las condiciones de extracción fueron uniformes, para lograr obtener resultados precisos.

Los solventes que fueron elegidos se escogieron con el fin de probar el nivel optimo para la extracción final y para ello se tuvo en cuenta sus respectivas polaridades siendo el menos polar el hexano, con polaridad media la mezcla Hexano: Etanol (1:1 v/v), y con polaridad mayor el etanol al 75%. Aunque la literatura habla de extracciones acuosas de la oleorresina, no se consideran como solvente extractor el agua ó soluciones etanólicas mas diluidas, ya que la eliminación del solvente es más difícil <sup>(10)</sup>.

##### **3.1.1 Extracción Soxhlet**

Posterior a las extracciones realizadas por el método Soxhlet y el método por maceración pasiva, se procedió a filtrar la oleorresina obtenida para eliminar partículas suspendidas que pudiera contener, el filtrado se paso a balones para una recuperación del solvente por medio de un equipo de rotaevaporación a una temperatura de 40 °C - 45 °C con una presión de vacío que dependió del solvente a retirar. Dicha concentración fue parcial, recuperándose solamente un 70% de la cantidad inicial del solvente.

Los valores adquiridos de las mediciones del rendimiento de la oleorresina, se ingresaron en una tabla de hoja electrónica (Microsoft Office Excel 97-2003) para

el análisis estadístico como se observa en la **tabla 7**. De esta forma, se halló el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación para cada grupo de datos.

De acuerdo a la extracción realizada por triplicado empleando el método Soxhlet, los tres solventes y el material vegetal en estado seco, se observó que con el etanol 75% se obtuvo un mayor rendimiento al extraer la oleorresina, con variación de los datos de 0,18%, mientras las variaciones de los datos para el Hexano- Etanol (1:1) (0,2%) y el hexano (2,12%) fueron mayores.

**Tabla 7. Extracción Soxhlet, material vegetal seco.**

Solvente	Ensayos	Masa Orégano (g)	Masa oleorresina (g)	Rendimiento (%)	Promedio (%)	Desviación estándar	Coficiente de variación
ETANOL 75%	1	24,97	7,16	28,68	28,7	0,05	0,18
	2	24,97	7,16	28,67			
	3	24,98	7,19	28,76			
HEXANO:ETANOL (1:1 v/v)	1	25,03	2,83	11,32	11,34	0,02	0,2
	2	25,04	2,84	11,35			
	3	25,14	2,92	11,36			
HEXANO	1	25,01	0,62	2,48	2,45	0,05	2,12
	2	24,99	0,65	2,39			
	3	24,95	0,57	2,48			

De la misma manera se graficó en el programa GraphPad Prism Visión 5.00 para Windows (GraphPad software Inc., San Diego California USA) los porcentajes de rendimiento de la extracción por el método Soxhlet empleando el material vegetal seco como puede observarse en la **figura 9**.

## EXTRACCIÓN SOXHLET

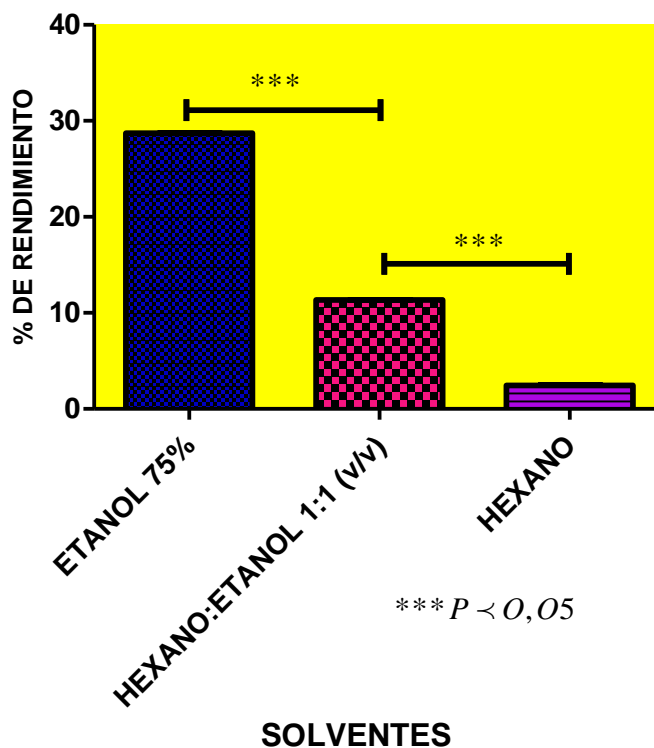


Figura 9. Porcentajes de rendimiento de la oleoresina de orégano, empleando el método Soxhlet y el material vegetal seco.

Para comparar los diferentes resultados obtenidos, en cuanto al solvente empleado y la presentación del material vegetal se realizó ANOVA (análisis de varianza) y el test de comparación múltiple Tukey para encontrar diferencias significativas.

En la **tabla 8** se muestran los datos arrojados por el programa de acuerdo a los análisis previamente seleccionados. Los resultados por ANOVA y el test de Tukey exponen una diferencia significativa ( $P < 0,05$ ) entre los diferentes solventes y un máximo de 28,70 como puede observarse en la **figura 9**. Se presume que esta diferencia puede ser debida a la diferencia de polaridad de los solventes, ya que estos arrastran del material vegetal los compuestos afines con la polaridad que esté presente <sup>(20)</sup>.

**Tabla 8. Resultado del análisis ANOVA y el test de comparación múltiple de Tukey**

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	Q	Significant? P < 0.05 ?	Summary	95% CI of diff
ETANOL 75% vs ETANOL-HEXANO	17,36	696	Yes	***	17.25 to 17.47
ETANOL 75% vs HEXANO	26,25	1053	Yes	***	26.14 to 26.36
ETANOL-HEXANO vs HEXANO	8,892	356,5	Yes	***	8.784 to 9.000

### 3.1.2 Extracción por maceración pasiva

De acuerdo a la **tabla 9** el porcentaje en masa más alto corresponde al solvente Etanol al 75% comparando el método de extracción por maceración pasiva, los tres solventes y el material vegetal seco; los análisis se realizaron por triplicado con una variación mínima entre los datos de 0,23% para el solvente Etanol al 75%; mientras que con el solvente Hexano: Etanol (1:1) y hexano la variación de los datos es de 1,44% (Hexano: Etanol (1:1)) y 8,57% (hexano).

**Tabla 9. Extracción por maceración pasiva, material vegetal seco.**

Solvente	Ensayos	Masa Orégano (g)	Masa oleorresina (g)	Rendimiento (%)	Promedio (%)	Desviación estándar	Coefficiente de variación
ETANOL 75%	1	24,97	4,5	18,03	18,01 (a)	0,04	0,23
	2	24,98	4,52	18,11			
	3	24,98	4,6	18,4			
HEXANO:ETANOL (1:1 v/v)	1	25,07	1,57	6,25	6,27 (b)	0,09	1,44
	2	25,02	1,55	6,19			
	3	25,09	1,6	6,36			
HEXANO	1	24,81	0,83	0,04	0,03 (c)	0,01	8,57
	2	24,94	0,88	0,04			
	3	25,16	0,79	0,03			

Según ANOVA y el test de comparación múltiple de Tukey mostrados en la **Tabla 10** al extraer la oleorresina por el método de maceración pasiva se obtuvieron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los valores de los solventes empleados.

Estas diferencias demuestran que el solvente etanol al 75%, tiene más afinidad con el material vegetal.

**Tabla 10. Resultado del análisis ANOVA y el test de comparación múltiple de Tukey**

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	Q	Significant? P < 0.05 ?	Summary	95% CI of diff
Etanol vs Etanol-Hexano	11,91	203,9	Yes	***	11.62 to 12.20
Etanol vs Hexano	18,14	310,6	Yes	***	17.85 to 18.44
Etanol-Hexano vs Hexano	6,232	106,7	Yes	***	5.938 to 6.527

### 3.1.3 Extracción Soxhlet material húmedo

De las extracciones con el material vegetal húmedo solamente se obtuvo un sólo resultado ya que dichas extracciones se realizaron para comparar si al secar el material vegetal se degradan compuestos y se pierden propiedades (físicas, químicas), y por tanto la oleorresina puede adquirir diferentes características y propiedades .

En la **Tabla 11**, se muestran los datos con el método soxhlet empleando el material vegetal en estado húmedo y los tres solventes (Etanol 75%, Hexano: Etanol (1:1), Hexano).

**Tabla 11. Extracción Soxhlet, material vegetal húmedo**

Solvente	Ensayos	Masa Orégano (g)	Masa oleorresina (g)	Rendimiento (%)
ETANOL 75%	1	24,93	5,88	23,57
HEXANO:ETANO L (1:1 v/v)	1	25,17	2,57	10,2
HEXANO	1	24,97	1,36	5,44

El análisis ANOVA y El test de comparación múltiple de Tukey no se pudo realizar ya que no hay suficientes datos para obtener un resultado, y por tanto solamente se realizó un análisis estadístico sencillo: Promedio, Desviación estándar y Coeficiente de variación. De esta forma, se halló que el solvente Etanol al 75% en

comparación con los otros solventes fue el que obtuvo mayor rendimiento con un de 13,37% más que la mezcla Hexano: Etanol (1:1) y 18,13% más que el Hexano.

En la **figura 10** se observan las diferencias de rendimiento según el solvente empleado.

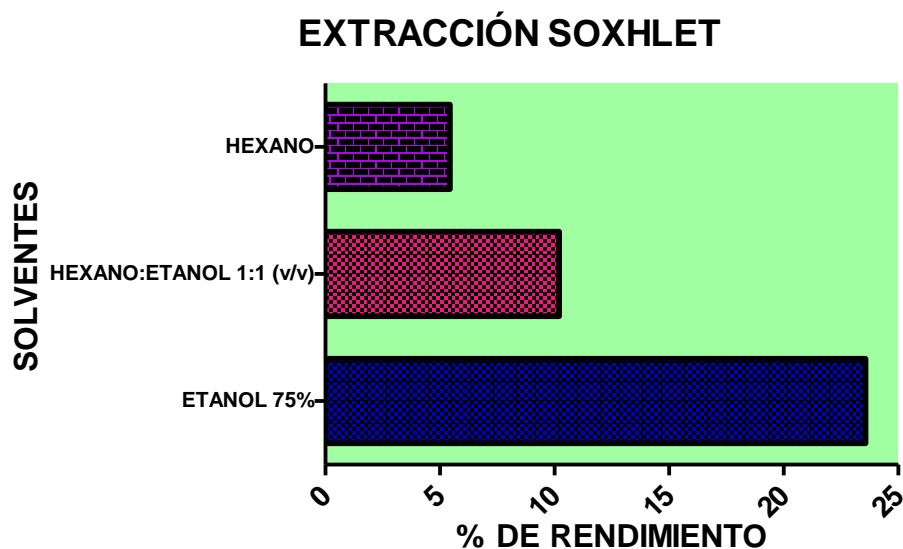


Figura 10. Porcentajes de rendimiento de la oleorresina de orégano, empleando el método Soxhlet y el material vegetal Húmedo.

### 3.1.4 Extracción por maceración pasiva del material vegetal húmedo

De las extracciones con el material vegetal húmedo solamente se obtuvo un sólo resultado ya que dichas extracciones se realizaron para comparar si al secar el material vegetal se degradan compuestos y se pierden propiedades (físicas, químicas), y por tanto la oleorresina puede adquirir propiedades y características diferentes.

En la **Tabla 12**, se muestran los datos con el método soxhlet empleando el material vegetal en estado húmedo y los tres solventes (Etanol 75%, Etanol-Hexano, Hexano).



Tabla 12. Extracción por maceración pasiva, material vegetal húmedo.

Solvente	Ensayos	Masa Orégano (g)	Masa oleorresina (g)	Rendimiento (%)
ETANOL 75%	1	25,11	3,57	14,22
HEXANO:ETANOL (1:1 v/v)	1	24,99	1,57	6,27
HEXANO	1	25,12	0,79	3,14

El análisis por ANOVA y El test de comparación múltiple de Tukey no se pudo realizar ya que no hay suficientes datos para obtener un resultado, y por tanto solamente se hizo un análisis estadístico sencillo en una tabla de hoja electrónica (Microsoft Office Excel 97-2003 para el análisis estadístico). De esta forma, se halló que el solvente Etanol al 75% fue el que obtuvo mayor rendimiento con un valor de 7,95% más que la mezcla Hexano: Etanol (1:1) y 11,07% más que el Hexano.

En la **figura 11** se observan las diferencias de rendimiento según el solvente empleado.

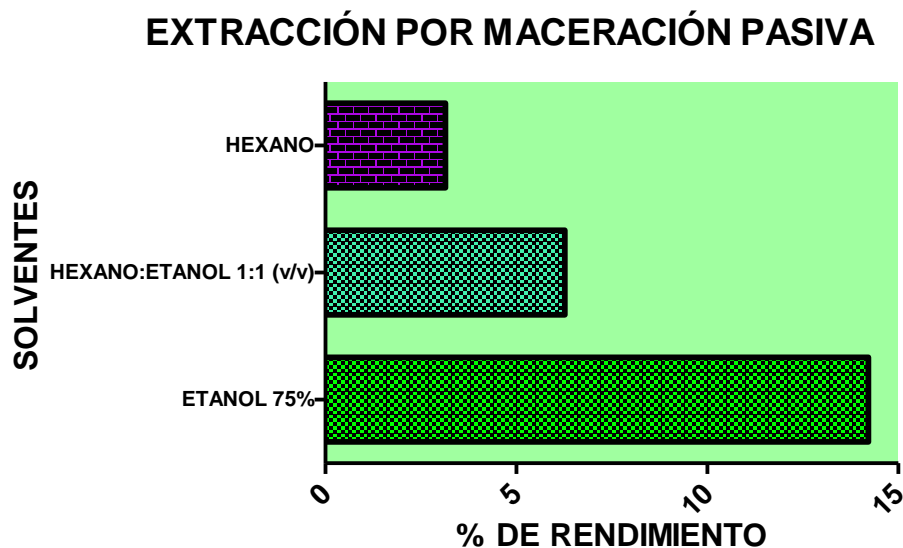


Figura 11. Porcentajes de rendimiento de la oleorresina de orégano, empleando el método por maceración pasiva y el material vegetal húmedo.

### 3.1.5 Comparación de los porcentajes de rendimiento de la oleorresina de Orégano empleando el método de extracción Soxhlet y maceración pasiva (material vegetal seco)

Con base en la **tabla 13**, al realizar ANOVA se obtuvieron diferencias significativas de ( $P < 0,05$ ) entre el método Soxhlet y el método por maceración pasiva, mostrando diferencias en el rendimiento de 10,65% tomando como base el solvente Etanol al 75% como se observa en la **figura 12**.

Por tanto el método Soxhlet es el que obtuvo una mayor eficiencia en comparación con el método por maceración pasiva.

**Tabla 13. Resultado del análisis ANOVA para el método Soxhlet y Maceración pasiva (material seco)**

Table Analyzed	Row stats of Data 4
Column A	Soxhlet
Vs	Vs
Column B	Maceración pasiva
Wilcoxon signed rank test	
P value	0,0039
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	**
Are medians signif. different? ( $P < 0.05$ )	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of positive, negative ranks	45.00 , 0.0000
Sum of signed ranks (W)	45,00
How effective was the pairing?	
rs (Spearman, Approximation)	0,9167
P Value (one tailed)	0,0003
P value summary	***
Was the pairing significantly effective?	Yes

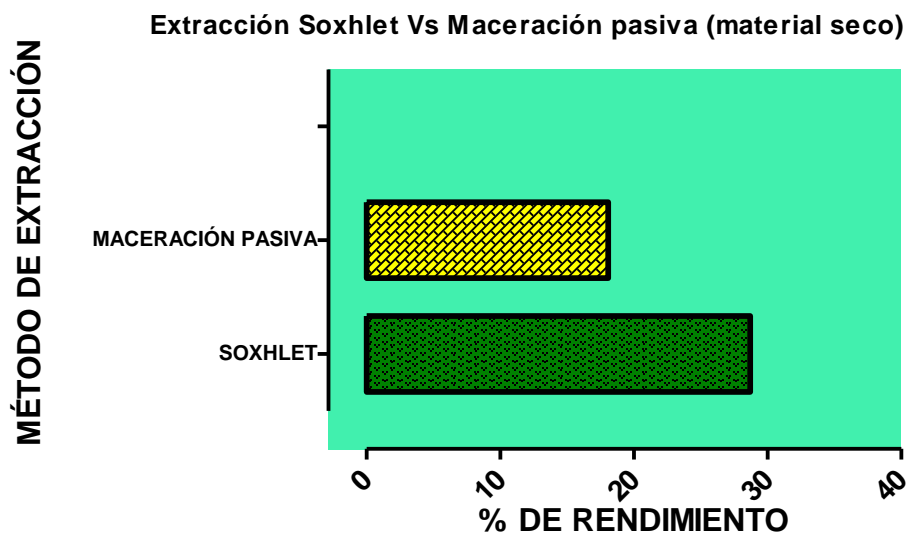


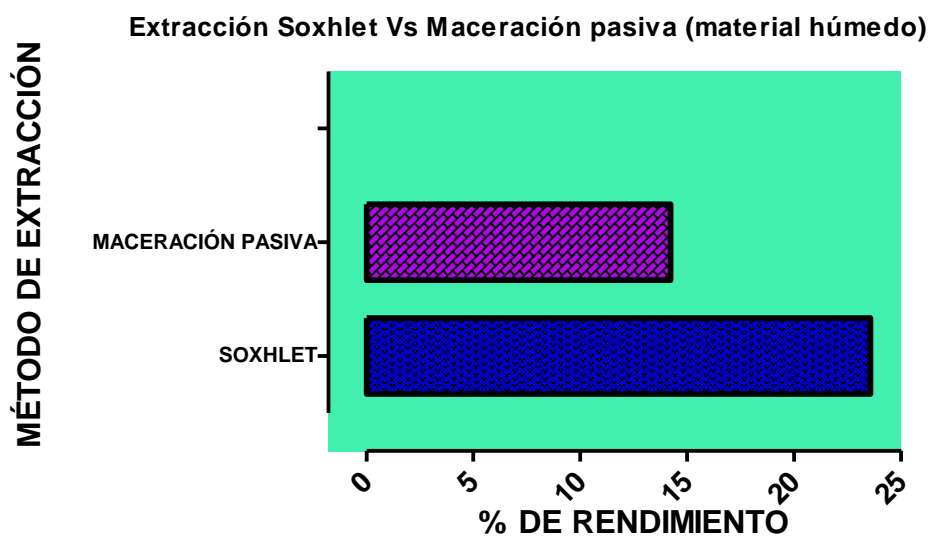
Figura 12. Porcentajes de rendimiento de la oleorresina de orégano, empleando el método Soxhlet y Maceración pasiva (material vegetal seco).

### 3.1.6 Comparación de los porcentajes de rendimiento de la oleorresina de Orégano empleando el método de extracción Soxhlet y maceración pasiva (material vegetal húmedo)

Al observar la **tabla 14** donde se encuentran los resultados analizados por ANOVA se observa que no hay una diferencia significativa ( $P < 0,05$ ) entre los porcentajes obtenidos por el método soxhlet y los obtenidos por el método por maceración pasiva. Por tanto al emplear el material vegetal húmedo se presenta un bajo rendimiento para ambos métodos con una diferencia de 2,3%, rendimiento que se halla al tomar como base los datos presentados por el solvente Etanol al 75%, datos que se encuentran reflejados en la **figura 13**.

**Tabla 14. Resultado del análisis ANOVA para el método Soxhlet y Maceración pasiva (material húmedo)**

Table Analyzed	Row stats of Data 4
Column A	Soxhlet
Vs	Vs
Column B	Maceración pasiva
Wilcoxon signed rank test	
P value	0,2500
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	Ns
Are medians signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of positive, negative ranks	6.000 , 0.0000
Sum of signed ranks (W)	6,000
How effective was the pairing?	
rs (Spearman)	1,0000
P Value (one tailed)	0,1667
P value summary	Ns
Was the pairing significantly effective?	No



**Figura 13. Porcentajes de rendimiento de la oleorresina de orégano, empleando el método Soxhlet y por maceración pasiva (material vegetal Húmedo)**

## **3.2 Comparaciones del rendimiento de la oleorresina de orégano con otras oleorresinas**

### **3.2.1 Comparación de los porcentajes de rendimiento de la oleorresina de Orégano (*Origanum vulgare*) con la oleorresina de ajo blanco (*Allium sativum*) empleando el método Soxhlet**

Para realizar esta comparación se tomo el orégano en estado seco, y el ajo blanco sin deshidratar (estado natural), ambas especies fueron extraídas por el método Soxhlet y los solventes (etanol 75%, Hexano: Etanol (1:1), Hexano).

De acuerdo al **ANEXO A**, se observa que al comparar los valores de rendimiento de las oleorresinas obtenidas entre el ajo blanco y el orégano empleando el método Soxhlet, el orégano fue el que obtuvo un mayor rendimiento mostrando diferencias de 15,05%(etanol 75%), 5,74%(Hexano: Etanol (1:1)), aunque con el solvente Hexano se presento un valor de -0,42% por tanto con este solvente el ajo blanco fue el que obtuvo un mayor porcentaje de rendimiento <sup>(20)</sup>.

### **3.2.2 Comparación de los porcentajes de rendimiento de la oleorresina de Orégano (*Origanum vulgare*) con la oleorresina de ajo blanco (*Allium sativum*) empleando el método por maceración pasiva**

Para realizar esta comparación se tomo el orégano en estado seco, y el ajo blanco sin deshidratar (estado natural), ambas especies fueron extraídas por el método por maceración pasiva y los solventes (etanol 75%, Hexano: Etano (1:1), hexano).

De acuerdo al **ANEXO B**, se observa que al comparar los valores de rendimiento de las oleorresinas obtenidas entre el ajo blanco y el orégano empleando el método por maceración pasiva, el ajo blanco fue el que obtuvo un mayor

rendimiento mostrando diferencias de 13,10%(etanol 75%), 5,3% (Hexano: Etanol (1:1)), 2,842%(hexano) <sup>(20)</sup>.

### **3.2.3 Comparación de los porcentajes de rendimiento de la oleorresina de Orégano (*Origanum vulgare*) con la oleorresina de ajo morado (*Allium sativum*) empleando el método Soxhlet**

Para realizar esta comparación se tomo el orégano en estado seco, y el ajo morado sin deshidratar (estado natural), ambas especies fueron extraídas por el método Soxhlet y los solventes (etanol 75%, Hexano: Etano (1:1), hexano).

De acuerdo al **ANEXO C**, se observa que al comparar los valores de rendimiento de las oleorresinas obtenidas entre el ajo morado y el orégano (seco) empleando el método Soxhlet, el orégano fue el que obtuvo un mayor rendimiento mostrando diferencias de 14,33%(etanol75%), 4,75%( Hexano: Etanol (1:1)), -2,84%(hexano), por tanto con este solvente el ajo morado fue el que obtuvo un mayor porcentaje de rendimiento <sup>(20)</sup>.

### **3.2.4 Comparación de los porcentajes de rendimiento de la oleorresina de Orégano (*Origanum vulgare*) con la oleorresina de ajo morado (*Allium sativum*) empleando el método por maceración pasiva**

Para realizar esta comparación se tomo el orégano en estado seco, y el ajo morado sin deshidratar (estado natural), ambas especies fueron extraídas por el método por maceración pasiva y los solventes (etanol 75%, Hexano: Etanol (1:1), hexano).

De acuerdo al **ANEXO D**, se observa que al comparar los valores de rendimiento de las oleorresinas obtenidas entre el ajo morado y el orégano (seco) empleando el método por maceración pasiva, el orégano fue el que obtuvo un mayor rendimiento con el solvente etanol, mostrando una diferencia de 8,23%(etanol

75%), pero al emplear los solventes Hexano: Etanol (1:1) y el hexano el ajo morado fue el que presento un mayor rendimiento con valores de 1,22%, 2,77%.

### 3.3 Análisis organoléptico

A pesar de que la evaluación sensorial es el análisis más subjetivo, porque el instrumento de medición es el ser humano, muchas veces define el nivel de aceptación o rechazo de un producto, por lo tanto es claro que un alimento que no resulte grato al paladar, a la vista o al olfato, no será aceptado aunque contenga todos los constituyentes nutritivos necesarios <sup>(18)</sup>, y por tanto al evaluar las oleorresinas estas presentaron una serie de características organolépticas las cuales se pueden observar en la **tabla 15**.

**Tabla 15. Análisis organoléptico de material vegetal seco y húmedo.**

MATERIAL VEGETAL	Propiedades y/o Características	Etanol 75%	Hexano: Etanol (1:1)	Hexano
<b>Seco de Soxhlet</b>	Color	Verde oscuro	Verde claro	Incoloro
	Olor	Aromático a menta	Débil, aromatizado	No hay presencia
	Sabor	Amargo	Amargo	Ninguno
	Aspecto	Líquida	Viscoso	Viscoso
<b>Seco de Maceración Pasiva</b>	Color	Verde	Verde claro	Incoloro
	Olor	Leve	Débil, aromatizado	No hay presencia
	Sabor	Amargo	Amargo	Ninguno
	Aspecto	Líquida	Viscoso	Viscoso
<b>Húmedo de Soxhlet</b>	Color	Verde oscuro	Verde oscuro	Incoloro
	Olor	Alcanforado	Leve	Leve
	Sabor	Amargo	Amargo	Amargo
	Aspecto	Viscoso	Viscoso	Pastoso
<b>Húmedo de Maceración Pasiva</b>	Color	Café	Café	Verde oscuro
	Olor	Leve	Leve	Leve
	Sabor	Amargo	Amargo	Amargo
	Aspecto	Pastoso	Pastoso	Viscoso

Si se estudia los resultados obtenidos, el análisis organoléptico demuestra que al obtener las diferentes oleorresinas por los distintos métodos de extracción, cada una conserva las características propias de la planta de la cual se extrajo.

### 3.3.1 Comparación del análisis organoléptico de la oleorresina de orégano con otras oleorresinas

- **Oleorresina del ajo blanco y ajo morado**

Las características organolépticas de las oleorresinas del ajo blanco y el ajo morado extraídas por el método Soxhlet y el método de maceración pasiva se pueden observar en la **tabla 16**.

**Tabla 16. Análisis organoléptico de la oleorresina del ajo blanco y ajo morado**

MATERIAL VEGETAL	Propiedades y/o Características	Etanol 75%	Hexano: Etanol (1:1)	Hexano
<b>Ajo blanco Soxhlet</b>	Color	Opaco	Amarillo claro	Incoloro
	Olor	Picante	Picante	Leve
	Sabor	Amargo	Amargo	Amargo
	Aspecto	Viscoso	Viscoso	Líquido
<b>Ajo blanco Maceración Pasiva</b>	Color	Opaco	Amarillo claro	Amarillo claro
	Olor	Picante	Picante	Leve
	Sabor	Amargo	Amargo	Amargo
	Aspecto	Viscoso	Viscoso	Líquido
<b>Ajo morado Soxhlet</b>	Color	Opaco	Morado claro	Incoloro
	Olor	Picante	Picante	Leve
	Sabor	Amargo	Amargo	Amargo
	Aspecto	Viscoso	Viscoso	Viscoso
<b>Ajo morado Maceración Pasiva</b>	Color	Opaco	Morado claro	Morado claro
	Olor	Picante	Picante	Leve
	Sabor	Amargo	Amargo	Amargo
	Aspecto	Viscoso	Viscoso	viscoso

Al comparar los análisis organolépticos de la oleorresina de orégano con las oleorresinas extraídas se puede observar que las oleorresinas extraídas con el solvente hexano empleando el método Soxhlet no presentan coloración; mientras que en el método por maceración pasiva estas presentan una clara coloración; además empleando el método Soxhlet se obtienen mejores características organolépticas de acuerdo a los resultados obtenidos en el laboratorio.



### 3.4 Análisis físico-químicos de la oleorresina de orégano

Las propiedades físicas- químicas de una grasa dependen de las propiedades de los ácidos que los componen. Los diferentes análisis se realizaron tomando en cuenta que la oleorresina obtenida por el método sólido-líquido Soxhlet empleando como solvente extractor Etanol al 75%. Dichos análisis se realizaron basados en reportes existentes sobre evaluaciones objetivas realizadas con las oleorresinas de Ajo <sup>(20)</sup>, Berenjena <sup>(29)</sup> y Pimentón <sup>(29)</sup>.

#### 3.4.1 Humedad de la planta de orégano

En la **tabla 17** se observa el resultado de la evaluación del porcentaje de humedad obteniéndose un dato promedio de 63.72% con una variación de los datos de 0,43% y una desviación de 0,27 lo cual indica que este método puede ser reproducible.

Al obtener un resultado de 63,72%, indica que el orégano tiene una gran cantidad de agua en sus tejidos debida a la zona donde se cultivo, ya que en áreas secas este vegetal reporta valores de 20-30%, y por tanto al presentar dicho valor tan alto esta dificulta la entrada de los solventes no polares como el hexano.

**Tabla 17. Porcentaje de humedad de la planta de orégano**

Ensayo	Masa de Orégano (g)	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Humedad (%m/m)	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación
1	2,9	2,9	1,05	63,83	63,72	0,27	0,43
2	2,99	2,99	1,1	63,41			
3	2,99	2,94	1,02	63,93			

### 3.4.2 Humedad en la Oleorresina de orégano

Los datos referenciados en la **Tabla 18**, muestran un valor promedio de 13,64% con una desviación estándar de las mediciones de 0,091, lo que indica una gran reproducibilidad de los datos, representada en una variación de 0,667%.

Dicho valor es pequeño en comparación al reportado en estudios realizados con la oleorresina de ajo blanco que reporta un valor de 19,178%<sup>(20)</sup>.

Por tanto, la oleorresina obtenida de orégano, presenta sustancias volátiles, agua de hidratación de compuestos que no alcanzaron a ser extraídas durante el proceso de rotaevaporación. Además se observa que hay presente un grado alto de concentración del material soluble ó en suspensión (86,36%), que presentaron polaridad suficiente para quedar retenidos en el solvente durante el proceso de extracción.

**Tabla 18. Porcentaje de humedad en la Oleorresina de orégano**

Ensayo	Masa de Orégano (g)	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Materia seca (%m/m)	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación
1	2,91	20,89	20,82	13,64	13,64	0,09	0,67
2	2,95	21,49	20,81	13,54			
3	3,03	21,53	20,83	13,72			

### 3.4.3 Porcentaje de cenizas presentes en la oleorresina de orégano

En la **tabla 19** se presenta el contenido de cenizas de la oleorresina de orégano obtenida, el solvente fue capaz de extraer un 0,26% de los minerales presentes en el orégano que presentan una desviación de 0,03, indicando una gran reproducibilidad de los datos, pero al analizar el coeficiente de variación datos se obtuvo un valor de 12,41% indicando que hay gran dispersión de estos.

La determinación de cenizas en la oleorresina, muestra que bajo las condiciones de extracción, el solvente fue capaz de extraer solo una pequeña cantidad de minerales presentes en el orégano a comparación del valor reportando en la oleorresina de ajo blanco (**ANEXO E**); dicho valor se puede corroborar con la

teoría, puesto que en estudios reportados muestran que esta planta no presenta sustancias azufradas, carbohidratos o minerales que formen parte del material seco<sup>(1)</sup>.

**Tabla 19. Porcentaje de cenizas en la oleorresina de orégano**

Ensayo	Masa de Orégano (g)	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Cenizas (%m/m)	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación
1	2,99	26,81	26,82	0,27	0,26	0,03	12,41
2	301	21,55	21,56	0,3			
3	3.01	21,7	21,71	0,23			

### 3.4.4 Densidad de la oleorresina de orégano

De acuerdo a los resultados mostrados en la **tabla 20** se puede decir que la densidad de la oleorresina reportó un valor de 0,99%, con una desviación estándar de 0,001, por lo tanto, este método proporciona una alta reproducibilidad y es preciso, lo cual se refleja en un bajo valor de dispersión de 0,1%.

Para el resultado obtenido en este análisis no se tuvo patrones cualitativos de comparación, ya que no se presentó un reporte específicos sobre el tema.

**Tabla 20. Densidad de la oleorresina de orégano**

Ensayo	Peso de la oleorresina (g)	Peso del agua (g)	Densidad (g/cm <sup>3</sup> )	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación
1	15,61	15,81	0,99	0,99	0,001	0,1
2	15,64	15,81	0,99			
3	15,63	15,81	0,99			

### 3.4.5 Índice de refracción y sólidos solubles (Grados Brix) de la oleorresina de orégano

Los resultados mostrados en la **Tabla 21** muestran una desviación estándar de de 0,002 y 0,000, lo que indica una gran reproducibilidad de los datos que se ve reflejado en una baja desviación de los datos presentando valores de 0,015% y 0,000%.

**Tabla 21. Índice de refracción de la oleorresina de orégano**

Ensayo	$N_D^{24}$	Brix (%)
1	1,35	49,00
2	1,35	49,00
3	1,35	49,00
<b>Promedio</b>	1,35	49,00
<b>Desviación Estándar</b>	0,0002	0,00
<b>Coefficiente de variación</b>	0,015	0,00

Los resultados obtenidos en estos análisis se compararon con presentados en la oleorresina del ajo blanco (**ANEXO F**), y se observa que la oleorresina de orégano presenta un valor menor para de índice de refracción y los grados Brix, por tanto la oleorresina de orégano es una sustancia que no presenta un alto contenido de sólidos solubles lo cual se refleja en un valor 49,00% (grados Brix) y una valor para el índice de refracción de 1,35, controlando así de forma sencilla la uniformidad alcanzada al momento de extraer la oleorresina.

### **3.4.6 Índice de acidez de la oleorresina de orégano**

Los resultados que muestran la **tabla 22** reportan un porcentaje de ácido oleico de 5,03% con una desviación de 0,003 y una variación de los datos de 0,06% nos indican que el análisis es reproducible.

Al comparar los datos obtenidos en la **tabla 22**, con los presentados para la oleorresina de ajo blanco en el (**ANEXO G**), se observa que al comparar el valor obtenido con la oleorresina de ajo blanco, la oleorresina de orégano presenta un porcentaje mayor porcentaje de acidez presentando una diferencia de 4,56% al compararse con la oleorresina del ajo blanco. Pero al comparar el valor obtenido con la oleorresina de pimentón y la berenjena (**ANEXO H**), estos presentan valores mayores.

Por tanto se intuye que dicha acidez proviene de las sustancias químicas que las componen, y en el caso del orégano dichas sustancias pueden ser los ácidos rosmarinico, palmítico, estearico, oleico ursolico cafeico.

**Tabla 22. Índice de acidez de la oleorresina de orégano**

Ensayos	Acido Oleico (%)
1	5,03
2	5,03
3	5,03
<b>Promedio</b>	5,03
<b>Desviación Estándar</b>	0,003
<b>Coefficiente de variación</b>	0,06

### 3.4.7 Propiedad antioxidante de la oleorresina de orégano

Se determino por triplicado obteniendo una serie de datos que se muestran en la **tabla 23**.

La **figura 14** muestra que la oleorresina de orégano no tiene actividad captora de radicales libres ya que esta no presenta un valor igual o aproximado al presentado por el control positivo de acido ascórbico de 0.89  $\mu\text{eq DPPH/g}$  ( $\text{IC}_{50}$  a una concentración de 415 ppm), el extracto de orégano tiene poca actividad ya que según la ecuación de la línea recta, el extracto de orégano presentaría un  $\text{IC}_{50}$  a una concentración de 35200 ppm, lo cual implica o de lo cual se puede concluir que el extracto no presenta compuestos con potencial antioxidante.

Lo cual significa meramente que su actividad antioxidante no está basada en la inhibición de la acción de radicales libres tipo DPPH<sup>(40)</sup>.

**Tabla 23. Propiedad antioxidante de la oleorresina de orégano.**

Ensayos	Concentración (ppm)	% $\text{IC}_{50}$
1	100	0,49
2	250	0,75
3	500	1,42
4	750	1,53
5	1000	2,09
6	1500	2,99
7	2000	3,37

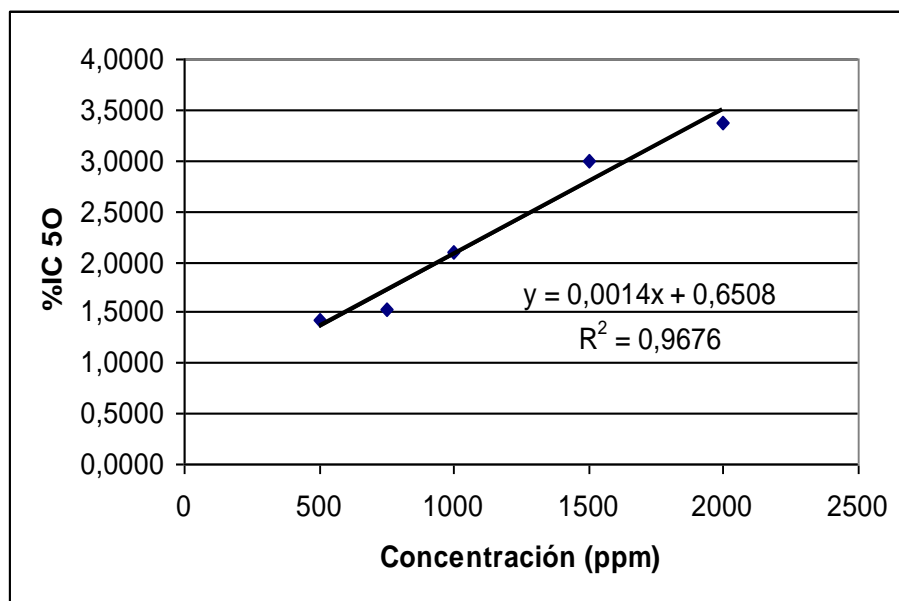


Figura 14. Propiedad antioxidante del extracto del orégano.

### 3. 5 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

Los análisis microbiológicos que se aplicaron a la oleorresina de Orégano, se realizaron con el propósito de identificar y cuantificar los microorganismos presentes, pues en todos los alimentos hay una determinada carga microbiana que debe estar controlada para evitar la pérdida de calidad y aptitud para el consumo.

Estos análisis fueron realizados teniendo en cuenta un procedimiento estándar, el cual incluyó la oleorresina recién extraída y la realización de diluciones desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-4}$  por la incertidumbre en el nivel de contaminación de la muestra.

#### 3.5.1 Análisis de Mesófilos, Mohos y Levaduras

Las **Tablas 24 y 25** presentan los resultados de la evaluación de Mesófilos, mohos y levaduras de la oleorresina obtenida por el método de extracción Soxhlet en el solvente etanol al 75%, empezando con el análisis quince días después de la extracción, debido a ausencia de reactivos.

El recuento microbiológico para las dos pruebas se llevo de acuerdo a la tabla estadística del número más probable (NMP) estandarizada <sup>(39)</sup>.

Al observar los resultados para mohos y levaduras se observa que en la primera dilución hay 53 UFC/mL, según la resolución 4241 de 1991 “Por la cual se definen las características de las especias o condimentos vegetales y se dictan normas sanitarias y de calidad de estos productos y de sus mezclas” <sup>(16)</sup>, se encontró que no se sobrepaso por la normatividad vigente ya que el nivel permisible de buena calidad es de 3000 UFC/mL. A pesar que el material vegetal fue desinfectado con una solución que tiene un aporte de cloro, esta presentó contaminación por tanto se considera que dicha contaminación puede ser debida a que el medio de trabajo no se encontraba completamente estéril ó que había una carga microbiana presente en el aire favoreciendo que el microorganismo se adaptara y aprovechara las ventajas que le pudieron haber dado factores involucrados como temperatura y alteración del pH entre otras. A pesar que la cantidad de este no es elevada se debe tener más cuidado ya que la presencia de dicho microorganismo puede degradar la oleorresina obtenida.

Para el caso del recuento de Mesófilos esta presento un valor de 0 UFC; este recuento refleja la calidad sanitaria de la oleorresina extraída, las condiciones de manipulación y las condiciones higiénicas de la materia prima.

**Tabla 24. Recuento de Mohos y Levaduras en la oleorresina de orégano**

Dilución	Recuento (Ensayos)			Recuento estándar en placa UFC/mL
	1	2	3	
Control	0	0	0	0
10 <sup>-1</sup>	5	5	6	53
10 <sup>-2</sup>	3	4	5	4
10 <sup>-3</sup>	0	0	0	0

**Tabla 25. Recuento de Mesófilos aerobios viables en la oleorresina de orégano**

Dilución	Recuento (Ensayos)			Recuento estándar en placa UFC/mL
	1	2	3	
Control	0	0	0	0
10 <sup>-1</sup>	0	0	0	0
10 <sup>-2</sup>	0	0	0	0
10 <sup>-3</sup>	0	0	0	0
10 <sup>-4</sup>	0	0	0	0

### 3.5.2 Determinación de coliformes totales y coliformes fecales E-coli:

Al observar los resultados del análisis de coliformes totales **tablas 26 y 27**, no se observó la acumulación de gas en las campanas invertidas de todas las diluciones, por lo tanto no se evidenció contaminación en la oleorresina. La determinación de coliformes fecales E-coli por fluorescencia UV, mostró que no había presencia de contaminación de la oleorresina en todas las diluciones, por lo tanto se obvió la realización de la prueba confirmativa.

Los resultados muestran que con la desinfección del material vegetal se logró evitar la contaminación tanto a las 24 horas y 48 horas de haber realizado la siembra; y empleando el método del número más probable, el recuento dio un valor menor a tres, lo cual se muestra que la oleorresina cumple con la resolución 4241 de 1991 del ministerio de salud pública colombiana <sup>(16)</sup>.

**Tabla 26. Prueba presuntiva para E- coli en la oleorresina de orégano**

Dilución	Recuento (Ensayos)		
	1	2	3
Pura	0	0	0
10 <sup>-1</sup>	0	0	0
10 <sup>-2</sup>	0	0	0
10 <sup>-3</sup>	0	0	0
10 <sup>-4</sup>	0	0	0
Recuento NMP	<3		



**Tabla 27. Determinación de Coliformes Fecales en la oleorresina de orégano**

Dilución	Recuento (Ensayos)		
	1	2	3
Pura	0	0	0
$10^{-1}$	0	0	0
$10^{-2}$	0	0	0
$10^{-3}$	0	0	0
$10^{-4}$	0	0	0
<b>Recuento NMP</b>	<3		

El análisis microbiológico se realizó con vistas a identificar y cuantificar los microorganismos presentes en la oleorresina, así como también constituye una poderosa herramienta en la determinación de la calidad sanitaria de un proceso de elaboración de alimentos, lo que permite identificar aquellas etapas que pueden favorecer la contaminación del producto; por tanto es aconsejable que los análisis microbiológicos se realicen con periodos prolongados de tiempo, para así poder llegar a determinar una posible inocuidad del producto.

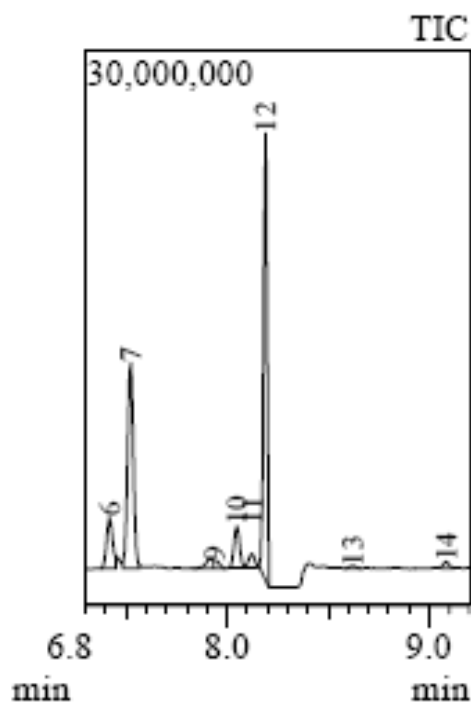
En muchos estudios sobre el orégano, se evidencia la presencia de las propiedades bactericidas del orégano debido a la presencia de timol, dicho compuesto inhibe la presencia de microorganismos patógenos anaerobios alimentarios como *C. perfringes* y *B. cereus*,<sup>(41)</sup>.

El estudio de las capacidades antimicrobianas del Orégano, permitirá proponer productos con valor agregado, que mejoren su posicionamiento en el mercado Nacional e Internacional, con una explotación sostenible de los recursos naturales y como una alternativa tecnológica para la reactivación del campo. El aceite esencia de Orégano cuenta con ingredientes activos que pueden poseer actividad antimicrobiana. Esto abre la posibilidad de evaluarlo como un aditivo natural para alargar la vida útil de alimentos perecederos, y como condimento para comida<sup>(42)</sup>.

### 3.6 Análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas (cg-ms) de la oleorresina del orégano

#### 3.6.1 Elucidación estructural de los compuestos de la oleorresina de orégano presentes en la fracción de hexano y acetonitrilo

Al superponer los dos cromatogramas se observó que el compuesto mayoritario se encontraba en ambas fracciones, a un tiempo de retención de 8,25 min como puede observarse en la **figura 15**.



**Figura 15. Región de 6,5 a 9,5 del TIC de las fracciones de Hexano y Acetonitrilo de la Oleorresina del Orégano.**

Este compuesto fue comparado con la biblioteca de espectros de la base de datos del equipo y se obtuvo el siguiente nombre:

- Timol

Al observar la **tabla 28, ANEXO I**, en donde la fracción de hexano y acetonitrilo presentan un compuesto identificado como timol y presenta un intervalo del

Porcentaje de Área de 93,35 – 96,16 % con respecto al área total: con igual tiempo de retención de 8,25.

Tabla 28. Compuestos presentes en la fracción de hexano y acetonitrilo.

FRACCIÓN	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	ÁREA	% ÁREA	COMPUESTO
HEXANO	5,13	47910	0,18	Linalool
	6,39	166418	0,63	Borneol
	6,51	190490	0,72	3-ciclohexen-1-ol,4-metil-1-(1-metiletil)
	7,51	424590	1,6	2,5-ciclohexadieno-1,4-diona,2-metil-5-(1-metiletil)
	8,25	25629778	93,35	Timol
ACETONITRILLO	6,4	354288	0,8	Borneol
	6,5	293070	0,66	3-ciclihexen-1-ol,4-metil-1-(1-metiletil)
	7,43	264262	0,6	5,9,9-Trimetil-spiro[3.5]non-5-en-1-one
	7,51	782743	1,77	2,5-ciclohexadieno-1,4-diona,2-metil-5-(1-metiletil)
	8,25	42441797	96,16	Timol

- De igual manera se observaron las demás señales encontradas en la fracción de hexano y acetonitrilo con un mismo tiempo de retención de 7,51 como puede observarse en la **figura 16**.

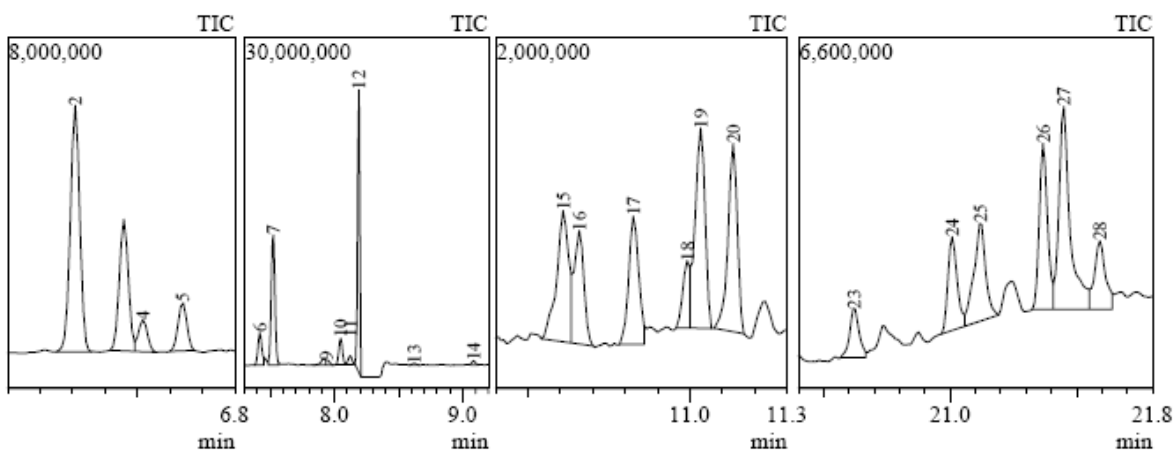


Figura 16. Tiempo de retención del compuesto, hallado en las fracciones de hexano y acetonitrilo.

Este compuesto fue comparado con la biblioteca de espectros de la base de datos del equipo y se obtuvieron los siguientes nombres:

- 2,5-Ciclohexadieno-1,4-diona, 2-metil-5-(1-metiletil)

Al comparar los datos obtenidos en la fracciones de hexano y acetonitrilo (**tabla 28, ANEXO J**) ambos corresponden al compuesto 2,5-Ciclohexadieno-1,4-diona, 2-metil-5-(1-metiletil), pero presentando un intervalo de porcentaje de área con un valor de 1,6 – 1,77%.

- De igual manera se observaron las demás señales encontradas en la fracción de hexano y acetonitrilo con un rango en el tiempo de retención de 6,5 – 6,51 como puede observarse en la **figura 16**.

Este compuesto fue comparado con la biblioteca de espectros de la base de datos del equipo y se obtuvieron los siguientes nombres:

- 3-Ciclohexeno-1-metanol, .alfa.,.alfa.,4-trimetil
- Alfa-terpineno

Al comparar los datos obtenidos en la fracciones de hexano y acetonitrilo (**tabla 28, ANEXO k**) ambos corresponden al compuesto 3-Ciclohexeno-1-ol,4-metil-1-(1-metiletil) presentando un intervalo del porcentaje de área con un valor de 0,66 – 0,72% .

- De igual manera se observaron las demás señales encontradas en la fracción de hexano y acetonitrilo con un intervalo en el tiempo de retención de 6,39 – 6,4 como puede observarse en la **figura 16**.

Este compuesto fue comparado con la biblioteca de espectros de la base de datos del equipo y se obtuvo el siguiente nombre:

- 1-borneol

Al comparar los datos obtenidos en la fracciones de hexano y acetonitrilo (**tabla 28, ANEXO L**) ambos corresponden al compuesto Borneol presentando un intervalo de porcentaje de área con un valor de 0,63 – 0,8%.

- Al estudiar las demás señales encontradas en la fracción de hexano, aparece un compuesto que presenta un tiempo de retención de 5,13 y un porcentaje de Área de 0,18% como puede apreciarse en la **figura 16**.

Este compuesto fue comparado con la biblioteca de espectros de la base de datos del equipo y se obtuvo el siguiente nombre:

- L-linalool

Al comparar los datos obtenidos en la fracción de acetonitrilo se observa en la (**tabla 28, ANEXO M**) que el compuesto no se encuentra presente en esta fracción y por tanto se deduce que es un compuesto apolar y por tanto sólo se presenta en dicha fase.

- Al estudiar las demás señales encontradas en la fracción de acetonitrilo, aparece un compuesto que presenta un tiempo de retención de 7,43 correspondiente al compuesto 5, 9, 9-Trimetill-spiro[3.5]non-5-en-1-one como puede apreciarse en la **tabla 28**.

Este compuesto fue comparado con la biblioteca de espectros de la base de datos del equipo y se obtuvo el siguiente nombre:

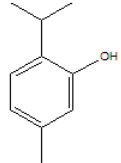
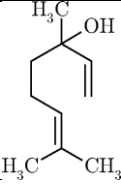
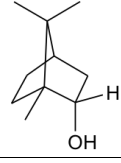
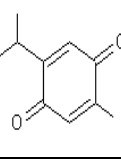
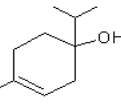
- 5, 9, 9-Trimetill-spiro[3.5]non-5-en-1-one

Al comparar los datos obtenidos en la fracción de hexano se observa en la (**tabla 28, ANEXO N**) que el compuesto no se encuentra presente en esta fracción y por

tanto se deduce que es un compuesto polar y por tanto sólo se presenta en dicha fase.

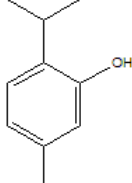
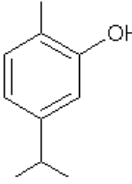
Estos análisis fueron muy importantes ya que al hacer una comparación entre las fracciones de Hexano y el Acetonitrilo se pudo concluir que los compuestos identificados en el Cromatograma son terpenos (Linalool y Borneol), monoterpenos (2,5-Ciclohexadieno-1,4-diona, 2-metil-5-(1-metiletil) y 3-Ciclohexeno-1-ol, 4-metil-1-(1-metiletil) y un compuesto fenólico (Timol), como se puede observar en la **tabla 29**.

**Tabla 29. Estructura de los compuestos presentes en las fracciones de Hexano y Acetonitrilo de la Oleorresina del Orégano**

Compuesto	Estructura
Timol	
Linalool	
Borneol	
2,5-Ciclohexadieno-1,4-diona, 2-metil-5-(1-metiletil)	
3-Ciclohexeno-1-ol, 4-metil-1-(1-metiletil)	

Siendo el timol el compuesto en mayor proporción encontrado en ambas fracciones, este posee una fuerte capacidad antibacteriana <sup>(44)</sup>. En estudios realizados anteriormente se ha encontrado que las plantas Lamiaceae contienen alto contenido de Timol y Carvacrol; el Timol es siempre acompañado de su isómero el Carvacrol como se puede observar en la **tabla 30**. Ambos compuestos son biológicamente activos, el Timol posee propiedades antisépticas y el Carvacrol posee propiedades antifúngicas <sup>(45)</sup>.

**Tabla 30. Estructuras del Timol y su correspondiente isómero el Carvacrol presentes en las plantas Lamiaceae.**

Compuesto	Estructura
Timol	
Carvacrol	

Se puede concluir que la ausencia del compuesto Carvacrol en la Oleorresina del Orégano se debe a que este por ser el isómero del Timol estén solapados y sea muy difícil su separación ya que se necesitarían equipos de alta definición, también se puede contemplar que una razón por la cual no este presente el Carvacrol en la oleorresina del orégano sea por su Quimiotipo ya que la presencia o ausencia de Timol o Carvacrol dependen de las condiciones ambientales y climáticas del cultivo del Orégano <sup>(44)</sup>.

Por lo tanto, los resultados pueden sugerir que *Origanum. vulgare* poseen compuestos con antimicrobianos que pueden ser utilizados para la conservación y / o extensión de la propia vida de los alimentos crudos y

procesados así como de medicamentos y terapias naturales de enfermedades infecciosas en humanos<sup>(45)</sup>.

### **3.6.2 comparación de los compuestos obtenidos por Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas de la oleorresina del orégano con las oleorresinas de ajo blanco y pimentón.**

Para la oleorresina del Orégano los componentes de interés obtenidos, fueron terpenos, monoterpenos y fenólicos; siendo el compuesto mayoritario el timol. El timol es un compuesto fenólico natural, considerado como un posible agente antiséptico y antibacterial presente en cantidades significativas en los aceites esenciales del género *Thymus*, *Origanum* y *Satureja*<sup>(44)</sup>.

Para la oleorresina del Pimentón Rojo (*Capsicum annuum l*) se reveló la presencia de algunos ácidos grasos esenciales como el ácido palmítico, esteárico, linoléico y pentil decanoato y algunos ésteres como el éster del ácido Etanoíico y del ácido benzoico<sup>(29)</sup>.

Para la oleorresina del Ajo Blanco (*Allium sativum*) muestra presencia de compuestos azufrados como los alil-zulfuros y las ditinas, compuesto responsable de las mayorías de las propiedades salutíferas y organolépticas del Ajo<sup>(20)</sup>.



#### 4. CONCLUSIONES

- Se obtuvo la oleorresina del Orégano (*Origanum vulgare*) por el método sólido-líquido soxhlet empleando como solvente extractor el etanol al 75%, el cual dio un rendimiento promedio de 28,70 % y una desviación de 0,053. El método empleado presentó un buen nivel de extracción, en comparación con los estudios realizados anteriormente empleando el mismo solvente.
- La caracterización de la oleorresina, realiza una descripción de los diferentes parámetros que se midieron, permitiendo un diagnóstico que identifica aspectos débiles para su futuro mejoramiento, adicionalmente esta se convierte en el primer paso para la elaboración de una oleorresina que pueda conservar una posible inocuidad durante largos periodos de tiempo.
- Durante el análisis por GC-MS de la fracción volátil separada en hexano y acetonitrilo, se muestra la presencia de cinco compuestos principales, siendo el compuesto predominante el timol, responsable de las características bactericidas y fungicidas del orégano.

## 5. RECOMENDACIONES

- Tener en cuenta que no se debe realizar un secado muy exhaustivo, ya que podemos ocasionar pérdida de componentes volátiles importantes en la composición de la Oleorresina.
- Antes de realizar el proceso de extracción es necesario una desinfección adecuada del material vegetal para evitar la presencia de coliformes totales y fecales.
- Evaluar la fase polar obtenida durante el proceso de extracción líquido-líquido con el fin de conocer su composición y una posible aplicación.
- Analizar las fracciones de la oleorresina en otros solventes polares, para así poder detectar otros componentes químicos extraídos del orégano.
- De acuerdo a los estudios hechos y reportados en la literatura es necesario realizar análisis físico-químicos durante un tiempo prolongado para controlar el momento en el que se comienza a degradar la oleorresina por efecto de la luz, absorción de humedad, evaporación de constituyentes volátiles, oxidación debida al aire y cambios debido a la acción de microorganismos.
- Implementar un seguimiento microbiológico ya que la oleorresina puede sufrir una serie de cambios con el paso del tiempo y esto podría afectar el uso comestible del extracto.
- Es indispensable al realizar el análisis microbiológico operar en condiciones de asepsia total, para lo cual se recomienda trabajar con cámara de flujo laminar, en un recinto pequeño, lo más cerrado posible, evitando al máximo comunicación con el medio externo, esterilizar guantes, tapabocas, gorras, batas, peras, etc y limpiar con cloro las mesas de trabajo.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. *Origanum vulgare* L. <http://www.herbotecnia.com.ar/exotica-oregano.html>  
(Septiembre 28 de 2009).
2. *Origanum vulgare* L. <http://ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal/uso-industrial-de-plantas-aromaticas-y-medicinales/contenidos/material-de-clase/tema10.pdf>  
(Septiembre 28 de 2009).
3. El orégano, posible alternativa de utilización en la producción animal.  
[http://www.aacporcinos.com.ar/articulos/nutricion\\_porcina\\_el\\_oregano.html](http://www.aacporcinos.com.ar/articulos/nutricion_porcina_el_oregano.html)  
(Septiembre 28 de 2009).
4. Plan hortícola nacional.  
[http://cadenahortofruticola.org/admin/bibli/310cap\\_7oregano.pdf](http://cadenahortofruticola.org/admin/bibli/310cap_7oregano.pdf) (Septiembre 30 de 2009).
5. Skuola , Gotsiou , Naxakis , Johnson CB. A chemosystematic investigation on the mono- and sesquiterpenoids in the genus *Origanum* (*Labiatae*). *Phytochemistry*. 52: 649-657. 1999.
6. Kokkini , Karousou , Dardioti , Krigas , Lanaras . Autumn essential oils of greek oregano. *Phytochemistry*. 44 (5): 883-886. 1997.
7. Pascual, Slowing , Carretero , Sánchez, Villar . *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: A review. *J. Ethnopharmacology*. 76, 201-214. 2001.

8. Justesen , Knuthsen . Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. Food Chemistry. 73, 245-250. 2001.
9. GIL, Edison. SÁEZ , Alex. Evaluación a escala de planta piloto del proceso industrial para la obtención de aceite esencial de cardamomo, bajo la filosofía “cero emisiones”. Universidad EAFIT. Procesos ambientales y biotecnológicos GIPAB. 66. Bogotá. 2005.
10. ARCILA, Cynthia. LOARCA, Guadalupe. Propiedades, Composición y Actividad Biológica De Los Componentes Del Orégano. Universidad Autónoma de Querétaro. Departamento de Ciencia de Alimentos y Nutrición Humana. Facultad de Química. Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República. 27, 28, 30. Querétaro. 2006.
11. RIVERA, Diego. Actividad Antioxidante de algunas especies de la familia Melastomataceae. Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnología. Escuela de Química. Pereira. 2007.
12. A system for detection of volatile antioxidant commonly emitted from spices and medicinal herbs. Química Nova vol.32 no.2 São Paulo 2009. Disponible en website:[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S01000422009000200035&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S01000422009000200035&script=sci_arttext) (Septiembre 30 de 2009).
13. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del Origanum vulgare (orégano). Disponible en website: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1018130X2001000100004](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018130X2001000100004). (Octubre 10 de 2009).

14. FERNÁNDEZ, Juan. Extracción convencional de oleorresina de pimentón dulce y picante I. Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT).Departamento de Ingeniería de Alimentos y Equipamiento Agrícola. 252-263. Cartagena. 2007.
15. ALEXANDER. Oleorresinas. Farm Direct Foods Latinamericana S.A. Última modificación 14 de diciembre, 2004. Consultada en marzo 20, 2008. Disponible en Website: <http://www.fdfa.com/prod09.htm>.(Septiembre 22 de 2009).
16. Resolución número 4241 de 1991. “Por la cual se define las características de las especias o condimentos vegetales y se dictan normas sanitarias y de calidad de estos productos y de sus mezclas”. Ministerio de salud Pública. Bogotá, Colombia. Abril 9 de 1991. Consultada en Octubre/2006. Disponible en Website: <http://www.invima.gov.co/version1/normatividad/alimentos/Resolucion%204241.html>
17. MATISSEC, R.; SCHNEPEL, F. M, STEINER,G,; Analisis de los alimentos: Grasas y sustancias acompañantes. Berlin, Alemania, 1992. Editorial: Springer-Verlag. GMBH & Co, KG.
18. MONTOYA, NAVARRETE, Carlos, Humberto. Manual del Laboratorio de Análisis de Alimentos. Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnología. Programa de Tecnología Química. Pereira, Enero de 2007. 4, 26, 47,54.
19. PEARSON, D.; Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 1976. Pág. 12.
20. GONZALEZ, PATIÑO, Paula Andrea. CARDONA, PAREJA, Leonardo. Obtención y caracterización de la oleorresina del ajo (*Allium sativum*). Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnología. Escuela de Química. 21, 28, 29, 30, 40, 46,58. Pereira. 2007.

21. Métodos de extracción para la separación cuantitativa de sustancias mediante solventes. Disponible en website:

<http://74.125.113.132/search?q=cache:HFCsXjAFERUJ:www.catlab.com.ar/notas.php%3Fidm%3D413%26accion1%3Dnotas+metodo+soxhlet+vs+extraccion+en+fri+o&cd=3&hl=es&ct=clnk&gl=us> (Octubre 10 de 2009).

22. Técnicas de extracción con disolventes orgánicos. Diponible en website:<http://www.google.com.co./search?hl=es&q=metodo+de+extraccion+por+a+gitacion+magnetica&meta=> (Octubre 17 de 2009)

23. Métodos cromatográficos.

<http://www.textoscientificos.com/quimica/cromatografia>. (Octubre 11 de 2009).

24. SKOOG. HOLLER. NIEMAN. Principios de análisis instrumental. Quinta edición. Editorial McGraww-Hill. Madrid, España 2001. Capitulo 20. 537-573

25. Instituto de Investigación de Recurso Biológicos "Alexander von Humboldt". Estudio del Mercado Colombiano de Aceites esenciales. Biocomercio Sostenible. 2003. Disponible en Website: [www.humboldt.org.co/biocomercio](http://www.humboldt.org.co/biocomercio).

26. AREVALO. Oleorresinas Componentes de las especias. Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos. Vol. 6 No. 25. Bogotá, Colombia. 1998. 26-30

27. YÉPEZ, RIVERA. y LOPEZ. Extracción de aceite esencial de limoncillo (*Cymbopogon citratus*) con Dióxido de Carbono supercrítico. Memorias del XXI Congreso Colombiano de Ingeniería Química. Santa Fé de Bogotá, 15 al 17 de Agosto de 2001.

28. SANTOS, Andrea. FAVARO, Carmen, FERREIRA, Carlos . Preparación y Caracterización de Microcápsulas de la Oleorresina de Páprica (*Capsicum*

*annuum l*) obtenidas por Atomización. Ciencia e Tecnología de Alimentos; 322-326. Junio del 2005.

29. CALDERON, Jeniffer. FLOREZ, Johanna. Obtención de la oleorresina de pimentón rojo (*Capsicum annuum l*) y berenjena (*Solanum melongena l*) y su posible uso industrial. Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnología. Escuela de Química. 14, 18,66 (ajo). Pereira. 2006.

30. PROVINI, GÜEMES, PIAGENTINI, Lavado desinfección con soluciones cloradas: una etapa para mejorar la calidad microbiológica de vegetales de hojas frescos cortados. Pirovani y Col. 2006. Universidad Nacional del Litoral, Argentina. 23-28. Consulta 15 Abril de 2009. Disponible en website: [http://www.ciad.mx/dtaov/XI\\_22VYTED/imagenes/files\\_pdf/brasil/maria.pdf](http://www.ciad.mx/dtaov/XI_22VYTED/imagenes/files_pdf/brasil/maria.pdf).

31. Uso adecuado del cloro en la desinfección poscosecha de frutas y vegetales. CDA boletín técnico N° 01, POSCOSECHA. Mayo 2003. consultada 15 de abril 2009. Disponible en website: [http://www.fintrac.com/docs/honduras/bt\\_01\\_poscosecha\\_cloro\\_05\\_03.pdf](http://www.fintrac.com/docs/honduras/bt_01_poscosecha_cloro_05_03.pdf).

32. LOPEZ, Diana, DURAN, Norma. Actividad Antifúngica de los extractos de las hojas de *Tibouchina Multiflora Metalostameae- Melastomatasea* Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnología. Programa de Tecnología Química. 41. Pereira marzo de 1997.

33. MORALE, José . Las hierbas un botiquín natural. Última modificación 13 de enero, 2008. Consulta 17 de septiembre, 2009. Disponible en Website: <http://www.scribd.com/doc/13782294/Taller-de-Fitoterapia>.

34. Norma Colombiana ICONTEC 432. Grasas y aceites comestibles. Método de determinación de densidad. Instituto Colombiano de Normas Técnicas, Santa Fé de Bogotá (1999). 29, 30.

35. Norma Colombiana ICONTEC. 289. Grasas y aceites comestibles. Determinación del índice de refracción. Instituto Colombiano de Normas Técnicas, Santa Fé de Bogotá (1999).32.
36. Norma Colombiana ICONTEC. 218. Grasas y aceites comestibles. Determinación del índice de refracción. Instituto Colombiano de Normas Técnicas, Santa Fé de Bogotá (1999).41
37. ESCOBAR, Lina. AGUDELO, Catalina. Actividad aleopática en maceta del extracto isopropanol-agua (65:35) de *Miconia caudata* (melastomataceae). Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de tecnología. Escuela de química.54. Pereira. 2007.
- 38 LOPEZ, Juan. Estandarización de la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para la identificación y cuantificación de metilesteres de ácidos grasos. Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de tecnología. Escuela de química. 23, 24, 25. Pereira. 2008
39. LONDOÑO, Bibiana. Diagnostico actual de la Oleoquímica en Colombia. Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnología. Escuela Química.37. Pereira 2004.
40. U. Undeger, A. Basaran, G. Degen, N. Basaran. Antioxidant activities of major thyme ingredients and lack of (oxidative) DNA damage in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells at low levels of carvacrol and thymol. *Science Direct* . Food and Chemical Toxicology 47 (2009). Consultada 20 de Noviembre 2009. Disponible en website: [www.elsevier.com/locate/foodchemtox](http://www.elsevier.com/locate/foodchemtox)



41. RANGEL, Sarahí. HERNANDEZ, Maria. SILVA, Ramon. RUELAS, Xochilt, LOPEZ, Ramiro. Aplicación del aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri schauer*) como antimicrobiano contra patógenos alimenticios. Autónoma Agraria Antonio Narro. Departamento de Nutrición y Alimentos.
42. PORTILLO, Martha. NEVAREZ, Guadalupe. GASTÉLUM, María. TORREZ, José. Efecto antifúngico del aceite esencia del orégano mexicano (*Lippia berlandieri schauer*) en un producto de panadería. Universidad Autónoma de Chihuahua. Profesional en Ciencias de Alimentos.
43. Fuselli. García de la Rosa. Gende. Eguaras. Fritz. Inhibición de Paenibacillus larvae empleando una mezcla de aceites esenciales y timol. Consultada 17 de octubre 2009. Disponible en website: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S032575412006000200010&script=sci\\_art\\_text](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S032575412006000200010&script=sci_art_text).
44. F. Sahin, M. Gulluce, D. Daferera, A. Sokmen, M . Sokmen, M. Polissiou, G. Agar, H. Ozer. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare ssp. vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Elsevier*. 26 de Agosto del 2003. Consultada 20 de Noviembre 2009. Disponible en website: [www.elsevier.com/locate/foodcont](http://www.elsevier.com/locate/foodcont).
45. ACEVEDO, Amner. CASTAÑEDA, Martha. BLANCO, Katerine. Composición y capacidad antioxidante de especias aromáticas y medicinales con alto contenido de Timol y Carvacrol. *Scientia Et Technica*. Vol XIII, número 033. Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira Colombia.

## ANEXOS

**ANEXO A: Tabla del porcentaje de rendimiento de la extracción de ajo blanco por medio de la extracción sólido-líquido Soxhlet.**

Solvente	Ensayos	Masa orégano (g)	Masa oleorresina (g)	Rendimiento (%)	Promedio (%)	Desviación estándar
ETANOL 75%	1	25,3795	3,5037	13,8052	13,6494	0,1517
	2	25,3423	3,4569	13,6408		
	3	25,3181	3,4185	13,5022		
HEXANO:ETANOL	1	25,2407	1,5559	6,1643	5,598	0,4904
	2	25,3108	1,3464	5,3195		
	3	25,0669	1,3322	5,3103		
HEXANO	1	25,0666	0,8344	3,3287	2,8768	0,4047
	2	25,6245	0,6529	2,548		
	3	25,363	0,6985	2,7537		

**ANEXO B: Tabla del porcentaje de rendimiento de la extracción de ajo blanco por medio de la extracción por maceración pasiva.**

Solvente	Ensayos	Masa orégano (g)	Masa oleorresina (g)	Rendimiento (%)	Promedio (%)	Desviación estándar
ETANOL 75%	1	25,4682	7,8901	30,9802	31,1764	0,1906
	2	25,1953	7,9014	31,3606		
	3	25,174	7,8521	31,1913		
HEXANO:ETANOL	1	25,4155	3,0798	12,1178	11,5676	0,4931
	2	25,3341	2,8287	11,1656		
	3	25,1931	2,8769	11,4194		
HEXANO	1	24,9686	0,4982	1,9953	2,0956	0,1791
	2	25,479	0,5068	1,9892		
	3	24,8485	0,5721	2,3024		

**ANEXO C: Tabla del porcentaje de rendimiento de la extracción de ajo morado por medio de la extracción sólido-líquido Soxhlet.**

Solvente	Ensayos	Masa orégano (g)	Masa oleorresina (g)	Rendimiento (%)	Promedio (%)	Desviación estándar
ETANOL 75%	1	25,1211	3,6003	14,3318	14,3678	0,0494
	2	25,3423	3,6554	14,4241		
	3	25,3181	3,6325	14,3474		
HEXANO:ETANOL	1	25,0979	1,6305	6,4966	6,5883	1,2782
	2	25,3675	1,3593	5,3584		
	3	25,0735	1,9833	7,9099		
HEXANO	1	25,1423	0,7373	2,9325	2,8633	0,0694
	2	25,1732	0,7209	2,8638		
	3	25,1964	0,7039	2,7937		

**ANEXO D: Tabla del porcentaje de rendimiento de la extracción de ajo morado por medio de la extracción por maceración pasiva.**

Solvente	Ensayos	Masa orégano (g)	Masa oleorresina (g)	Rendimiento (%)	Promedio (%)	Desviación estándar
ETANOL 75%	1	25,1055	2,4495	9,7578	9,8356	0,1560
	2	25,6028	2,5642	10,0153		
	3	25,1915	2,4523	9,7346		
HEXANO:ETANOL	1	25,2842	1,5205	6,0136	7,4869	1,5938
	2	25,1436	1,8275	7,2683		
	3	25,1089	2,3045	9,1788		
HEXANO	1	25,2160	0,7409	2,9382	2,8066	0,1964
	2	25,0345	0,7262	2,9008		
	3	25,1508	0,6491	2,5808		

**ANEXO E: Tabla del porcentaje de cenizas de la oleorresina de ajo blanco**

Ensayos	Cenizas (% m/m)
1	3,2210
2	3,2580
3	3,2590
<b>Promedio</b>	3,2460
<b>Desviacion estandar</b>	0,0217

**ANEXO F: Tabla del índice de refracción y el porcentaje de grados brix presentes en la oleorresina de ajo blanco.**

Ensayos	$n_D^{24}$	Brix
1	1,4755	74,00%
2	1,4755	74,00%
3	1,475	73,90%
<b>Promedio</b>	1,4753	73,97%
<b>Desviacion estandar</b>	$0,236 \cdot 10^{-3}$	0,0433

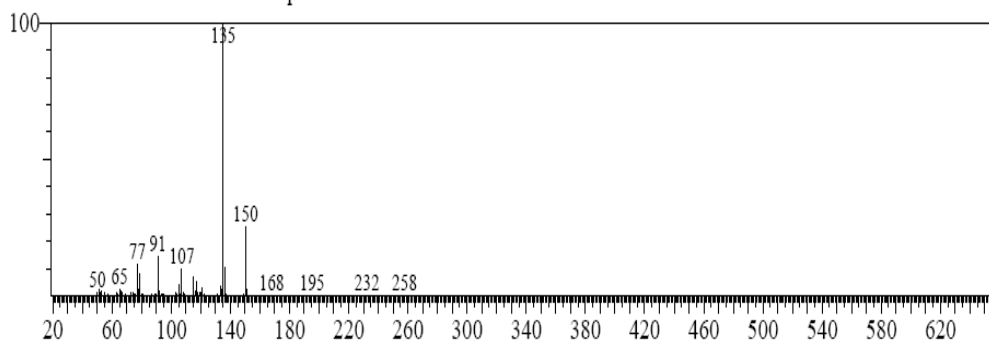
**ANEXO G: tabla del índice de acidez de la oleorresina de ajo blanco.**

Ensayos	Acido oleico (% m/m)
1	0,470
2	0,473
3	0,465
<b>Promedio</b>	0,469
<b>Desviacion estandar</b>	0,004

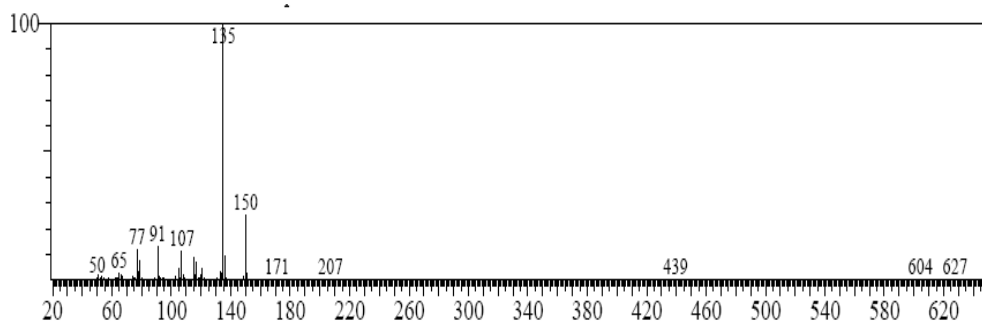
**ANEXO H: tabla del índice de acidez de la oleorresina de pimentón rojo y berenjena.**

Indice de acidez	% de acido oleico
Pimenton	37,41
Berenjena	42,74

**ANEXO I. Espectro de masas del compuesto timol de la oleorresina de orégano encontrado en la fracción de hexano, acetonitrilo.**

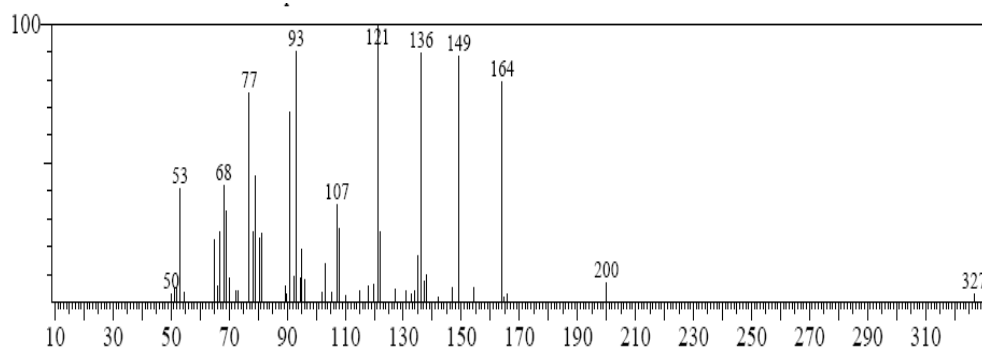


Hexano

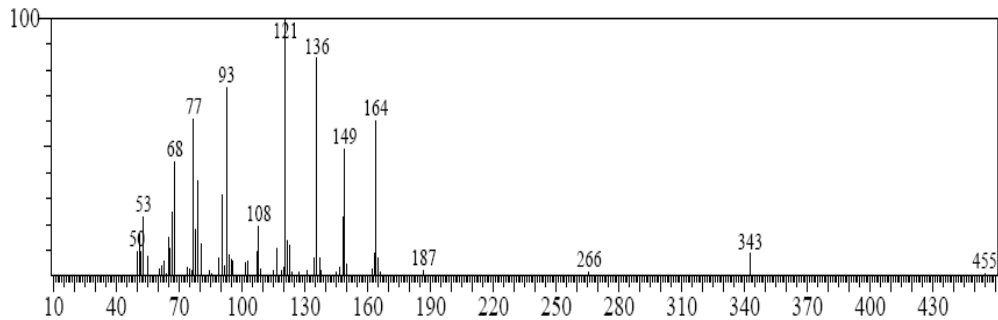


Acetonitrilo

**ANEXO J. Espectro de masas del compuesto 2,5-Ciclohexadiene-1,4-dione, 2-metil-5-(1-metiletil) de la oleorresina de orégano encontrado en la fracción de hexano, acetonitrilo.**

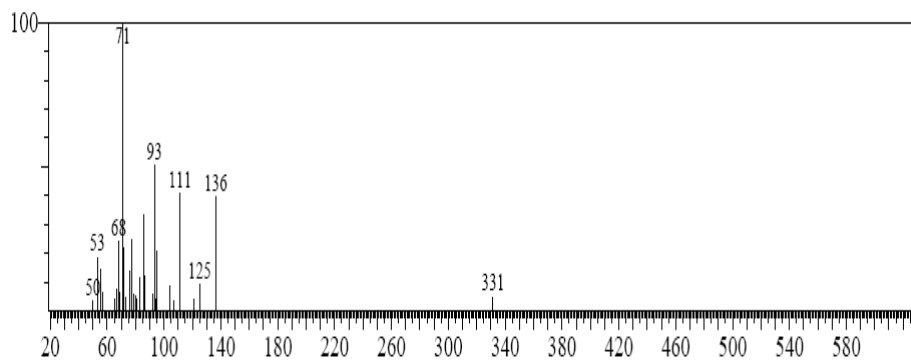


Hexano

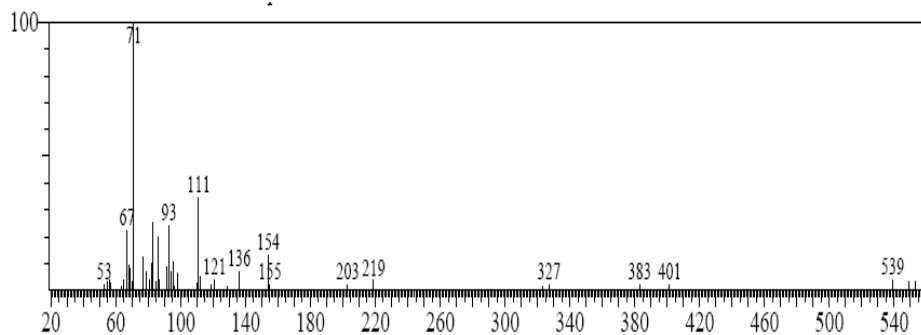


**Acetonitrilo**

**ANEXO K. Espectro de masas del compuesto 3-Ciclohexen-1-ol, 4-metil-1-(1-metiletil) de la oleorresina de orégano encontrado en la fracción de hexano, acetonitrilo.**

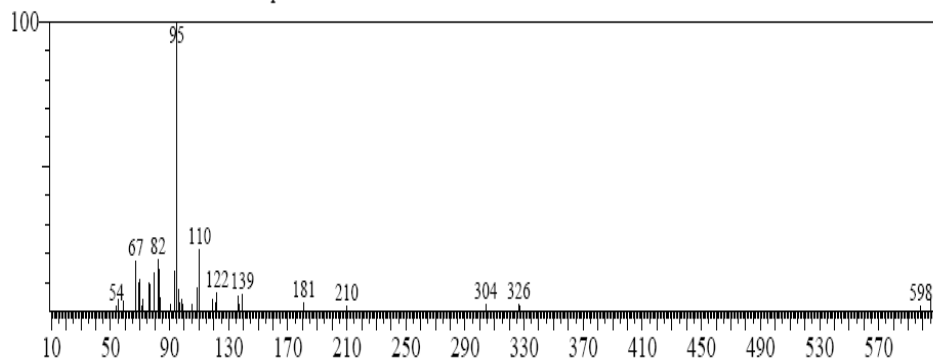


**Hexano**

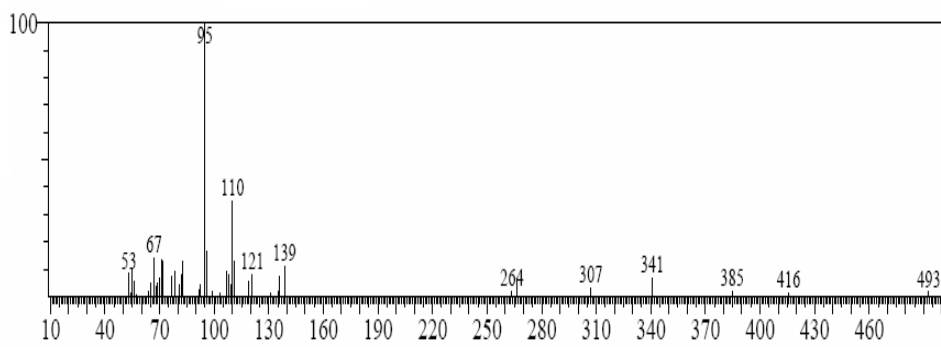


**Acetonitrilo**

**ANEXO L. Espectro de masas del compuesto Borneol de la oleorresina de orégano encontrado en la fracción de hexano, acetonitrilo.**

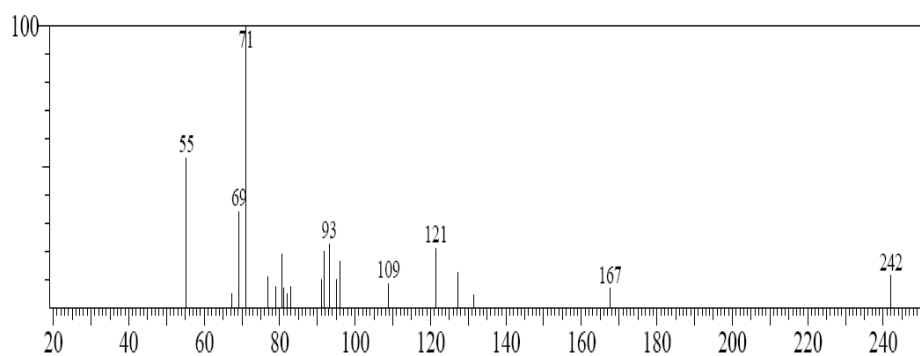


**Hexano**



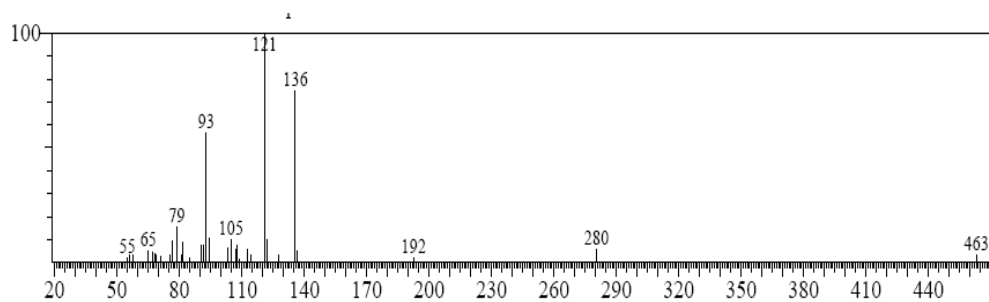
**Acetonitrilo**

**ANEXO M. Espectro de masas del compuesto Linalool de la oleorresina de orégano encontrado en la fracción de hexano.**



**Hexano**

**ANEXO N. Espectro de masas del compuesto 5, 9, 9-Trimetil-spiro[3.5]non-5-en-1-one de la oleorresina de orégano encontrado en la fracción acetonitrilo.**



**Acetonitrilo**