

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



OBTENCIÓN DE UN PRODUCTO ANTIOXIDANTE DE ACEITE ESENCIAL  
DE ORÉGANO *Poliomintha longiflora* Gray PARA SU APLICACIÓN  
A TRAVÉS DE EMULSIONES

Por

ALMA ELISA MORA ZUÑIGA

Como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS  
CON ACENTUACION EN ALIMENTOS

2023

OBTENCIÓN DE UN PRODUCTO ANTIOXIDANTE DE ACEITE ESENCIAL DE

ORÉGANO *Poliomintha longiflora* Gray PARA SU APLICACIÓN A TRAVÉS DE

EMULSIONES

**Comité de Tesis**

---

Dr. Juan Gabriel Báez González  
Presidente

---

Dra. Mayra Zulema Treviño Garza  
Secretario

---

Dr. Carlos Abel Amaya Guerra  
Vocal 1

---

Dra. Claudia Tomasa Gallardo Rivera  
Vocal 2

---

Dra. Sandra Loruhamá Castillo Hernández  
Vocal 3



---

Dra. Katiushka Arevalo  
Subdirección de Posgrado

OBTENCIÓN DE UN PRODUCTO ANTIOXIDANTE DE ACEITE ESENCIAL DE  
ORÉGANO *Poliomintha longiflora* Gray PARA SU APLICACIÓN A TRAVÉS DE  
EMULSIONES

**Dirección de Tesis**



---

Dr. Juan Gabriel Báez González  
Director



---

Dr. José Rodríguez Rodríguez  
Director Externo

## AVISO DERECHOS DE AUTOR

DERECHOS RESERVADOS©  
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

## AGRADECIMIENTOS

A todos los miembros del comité de tesis por brindarme su apoyo y asesoría en lo profesional, así como su tiempo para la realización de este trabajo de investigación.

A mis compañeros, amigos todos del Departamento de Ciencia de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, por acompañarme en el inicio y termino de esta tesis.

A todos mis amigos que a lo largo de este tiempo me brindaron su apoyo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo recibido para la obtención del grado de Doctor.

## DEDICATORIA

Gracias DIOS por permitirme estar para poder ser..

A mi esposo Miguel, así como a mis hijos: Diana, Héctor y Rodrigo.

A mis padres: Héctor Ismael Mora Castillo (†), Delfina Zúñiga Medina y mis hermanas:  
Sandra y Sonia.

Gracias por estar y ser mi familia...

## INDICE GENERAL

	Pagina
Introducción .....	1
Antecedentes.....	2
Justificación.....	38
Hipótesis.....	29
Objetivo general .....	30
Objetivos particulares.....	30
Material y método .....	31
Resultados y discusión.....	51
Conclusiones .....	95
Perspectivas.....	96
Bibliografía .....	96

## INDICE DE TABLAS

Tabla	Pagina
1 Composición nutritiva del orégano por 100 gramos.....	13
2 Principales métodos de extracción de aceites esenciales.....	14
3 Formulaciones de emulsiones de AEO con GA y Q.....	37
4 Formulaciones de AL y EAL para medir la capacidad antioxidante del AEO	40
5 Preparación de soluciones para curva de calibración de determinación de TBARS.....	42
6 Formulaciones de EAL con GM y Q por MT y método DCC para medir la capacidad antioxidante del AEO .....	43
7 Formulaciones de EAL con GA y Q por MT y método DCC para medir la capacidad antioxidante del AEO .....	45
8 Formulaciones de secado de AEO con GA y Q para obtener microcápsulas mediante el proceso de secado por aspersion (Spray dry).....	47

9	Características fisicoquímicas de los AEO, índice de refracción (I.R.) y densidad.....	54
10	Tasa de coalescencia y potencial $\zeta$ en emulsiones de AEO.....	65
11	Tasa de coalescencia y potencial $\zeta$ en EAL-MT y EAL-DCC.....	77
12	Tasa de coalescencia y potencial $\zeta$ en EAL-MT y EAL-DCC.....	82
13	Características fisicoquímicas de microcápsulas (MC).....	86
14	Retención total de AEO (RT) y eficiencia de microencapsulado (ME).....	89
15	Porcentaje de Carvacrol y timol en AEO sin encapsular y AEO microencapsulado.....	91
16	Composición media en áreas relativas %, (n=3) de compuestos volátiles en AEO y AEO retenido en microcápsulas.....	93

#### INDICE DE FIGURAS

Figura		Pagina
1	Interacción de antioxidantes con RL.....	4
2	Principio químico del método DPPH.....	8
3	Formación del radical ABTS y reacción del catión-radical ABTS+• con compuestos fenólicos.....	9
4	Reacción del radical AAPH durante el ensayo ORAC.....	10
5	Cultivo de Orégano <i>Poliomintha longiflora</i> en el estado de Nuevo León...	12
6	Estructuras químicas de los principales compuestos presentes en el orégano	16
7	Emulsión (O/W) aceite como fase dispersa y agua como fase continua y región interfacial.....	20
8	Procesos físicos de inestabilidad de las emulsiones. ....	21
9	Diagrama general de flujo de la investigación.....	31
10	Localización del municipio de Higueras en el mapa de Nuevo León.....	51
11	Cultivo de <i>Poliomintha longiflora</i> Gray en el municipio de Higueras.....	51
12	Hojas y cáliz de orégano cultivado <i>Poliomintha longiflora</i> Gray en el municipio de Higueras.....	52



13	Destilador de arrastre de vapor adaptado con una autoclave a nivel laboratorio.....	52
14	Rendimiento (%) de AEO obtenido por arrastre de vapor en hoja y mixto en tres temporadas.....	53
15	Polifenoles totales en equivalentes de ácido gálico (GAE mg/g) en AEO de hojas y mixto de tres temporadas.....	55
16	Actividad antioxidante por DPPH en porcentaje de inhibición del radical DPPH de los AEO de las muestras de hoja y mixto de tres temporadas.....	56
17	Actividad antioxidante por ABTS en micromoles equivalentes de Trolox (TEAC $\mu\text{mol}/100\text{g}$ ) de los AEO .....	57
18	Actividad antioxidante en Unidades ORAC (TE $\mu\text{moles}/100\text{g}$ ) de los AEO de las muestras de hoja y mixto de tres temporadas.....	58
19	Contenido en porcentaje de timol en los AEO de las muestras de hoja y mixto de tres temporadas.....	59
20	Contenido en porcentaje de carvacrol en los AEO de las muestras de hoja y mixto de tres temporadas.....	60
21	Contenido total en porcentaje de timol y carvacrol en AEO de las muestras de hoja y mixto de tres temporadas.....	61
22	Formulados de AEO emulsionado con GA y Q.....	62
23	Porcentaje (%) de actividad antioxidante (AA) en emulsiones de AEO con diferentes relaciones de material de pared y AEO.....	63
24	Porcentaje (%) de inhibición del radical DPPH en emulsiones de AEO con diferentes relaciones de material de pared y AEO.....	64
25	Tamaño de partícula en cinética de 90 días en emulsiones de AEO.....	65
26	Porcentaje (%) de composición de omega 3, 6 y 9 .....	66
27	Formación de hidroperóxidos en cinética de 40 días en EAL y AL.....	68
28	Formación de TBARS en cinética de 40 días en EAL y AL.....	68
29	Formación de hidroperóxidos en cinética de 40 días en EAL.....	69
30	Formación de TBARS en cinética de 40 días en EAL.....	70
31	Formación de hidroperóxidos en cinética de 40 días en AL.....	70
32	Formación de TBARS en cinética de 40 días en AL.....	71

33	Formación de hidroperóxidos en EAL-DCC y EAL-MT.....	72
34	Formación de TBARS en EAL-DCC y EAL-MT.....	72
35	Formación de hidroperóxidos en EAL-DCC.....	73
36	Formación de TBARS en EAL-DCC.....	74
37	Formación de hidroperóxidos en EAL-MT.....	74
38	Formación de TBARS en EAL-MT.....	75
39	Porcentaje (%) de cremado en EAL-DCC y EAL-MT.....	76
40	Tamaño de partícula de EAL-DCC y EAL-MT.....	76
41	Formación de hidroperóxidos de EAL-DCC y EAL-MT.....	78
42	Formación de TBARS en EAL-DCC y EAL-MT.....	78
43	Formación de hidroperóxidos en EAL-DCC.....	79
44	Formación de TBARS en EAL-DCC.....	79
45	Formación de hidroperóxidos en EAL-MT.....	80
46	Formación de TBARS en de EAL-MT.....	81
47	Porcentaje (%) de cremado EAL-DCC y EAL-MT.....	81
48	Tamaño de partícula en EAL-DCC y EAL-MT.....	82
49	Emulsiones elaboradas por el método DCC .....	83
50	Densidad de carga (potencial - $\zeta$ ) con GA y Q.....	84
51	Formulas de emulsiones de AEO para obtener microcápsulas.....	84
52	Obtención de microcápsulas por Spray Dry.....	85
53	Micrografías de microcápsulas de AEO.....	87
54	Tamaño de partícula de microcápsulas.....	88
55	Distribución de tamaño de partícula de microcápsula.....	88
56	Perdida de AEO y Retención total de AEO en microcápsulas.....	90
57	Cromatograma de AEO antes de la microencapsulación.....	92
58	Cromatograma de AEO microencapsulado.....	92
59	Actividad antioxidante de AEO contenido en microcápsulas .....	94

## INDICE DE ECUACIONES

Ecuación	Pagina
1 Rendimiento de aceite esencial de orégano.....	32

2	Densidad de aceite de orégano .....	33
3	% de inhibición por ensayo DPPH.....	34
4	Tasa de coalescencia .....	37
5	Índice de cremado.....	38
6	Retención total de AEO.....	48
7	Eficiencia de microencapsulación .....	49

### LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AEO: aceite esencial de orégano

MT: método tradicional

DCC: deposición capa por capa

MCP: microcápsulas

EAL: emulsiones de aceite de linaza

GM: goma de mezquite

Q: quitosano

GA: goma arábica

AL: aceite de linaza

## RESUMEN

Los antioxidantes son capaces de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas, oxidándose ellos mismos. Como aditivo alimentario tienen la función de mantener la calidad de los alimentos, y en la salud, como suplemento evita la formación de especies reactivas de oxígeno y de radicales libres en el organismo. En la actualidad el uso de antioxidantes sintéticos ya no es preferido por los consumidores debido a las restricciones de carcinogenicidad que estos presentan, creándose la necesidad de reemplazarlos por sustancias de origen natural. Una alternativa puede ser el uso de aceites esenciales con actividad antioxidante. El aceite esencial de orégano (*Poliomintha longiflora* Gray) contiene sustancias como carvacrol y timol que son reconocidos como importantes antioxidantes, sin embargo su alta volatilidad, olor y sabor dificultan su aplicación directa por lo que una opción es la encapsulación a través de emulsiones, lo que además las protegería de su degradación. En consideración de lo antes mencionado en el presente estudio, se evaluó aceite esencial de orégano (AEO) obtenido de tres diferentes estadios del año (inverno, verano y otoño) de dos diferentes composiciones de la planta, 100% hoja (hoja) y otra de composición hoja:cáliz relación 82:18 % (mixto) a los cuales se les determinó el contenido de polifenoles totales así como su actividad antioxidante (AA) por ensayos ORAC, ABTS, y DPPH, se cuantificó carvacrol y timol por la técnica de cromatografía de gases. Se evaluó el AEO como antioxidante a diferentes concentraciones para proteger aceite de linaza emulsionado. También se desarrollaron emulsiones estables de AEO con gomas arábica y quitosano para obtener microcápsulas por spray dry a las cuales se les midió AA y contenido de timol y carvacrol antes y después del spray dry. Los resultados muestran que en otoño se tiene mayor rendimiento de AEO, así como la mayor AA con los ensayos ORAC y ABTS, en el ensayo de DPPH la mayor AA se obtuvo en las hojas. Los mayores contenidos de timol y carvacrol fueron en otoño y en hojas. Concentraciones mayores a 1200 ppm de AEO en aceite de linaza emulsionado presentaron más bien un efecto prooxidante y concentraciones menores un efecto antioxidante. En las microcápsulas obtenidas se obtuvieron valores de retención de AEO del 50% adicionalmente no se presentaron diferencias en la AA así como en las relaciones de timol y carvacrol antes y después de encapsular.

## ABSTRACT

Antioxidants are capable of slowing or preventing the oxidation of other molecules by oxidizing themselves. As a food additive they have the function of maintaining food quality, and in health, as a supplement they prevent the formation of reactive oxygen species and free radicals in the body. At present, the use of synthetic antioxidants is no longer preferred by consumers due to the restrictions of carcinogenicity that they present, creating the need to replace them with substances of natural origin. An alternative is the use of essential oils with antioxidant activity. The essential oil of oregano (*Poliomintha longiflora Gray*) contains substances such as carvacrol and thymol, which are recognized as important antioxidants; however, their high volatility, odor and flavor make their direct application difficult, therefore one option is encapsulation through emulsions, which would also protect them from degradation. In consideration of the above mentioned in the present study, essential oil of oregano (AEO) obtained from three different stages of the year (winter, summer and autumn) and of two different compositions of the plant, 100% leaf (leaf) and another of composition leaf:calyx ratio 82:18 % (mix) to which were determined the content of total polyphenols and the antioxidant activity (AA) by ORAC, ABTS, and DPPH assays, carvacrol and thymol were quantified by the gas chromatography technique. AEO was evaluated as an antioxidant at different concentrations to protect emulsified linseed oil against oxidation. Stable emulsions of AEO with gum arabic and chitosan were also developed to obtain microcapsules by spray dry, in which antioxidant activity and thymol and carvacrol content were measured before and after the spray dry process. The results show that the highest AEO yield was obtained in autumn, and also the highest AA with the ORAC and ABTS assays; in the DPPH assay, the highest AA was obtained in leaves. The highest thymol and carvacrol contents were in autumn and in leaves. Concentrations higher than 1200 ppm of AEO in emulsified linseed oil showed a prooxidant effect and lower concentrations an antioxidant effect. In the microcapsules obtained, AEO retention values of 50% were obtained, and there were no differences in the AA or in the thymol and carvacrol ratios before and after the encapsulation process.

## 1.0 INTRODUCCIÓN

Los antioxidantes como aditivo tienen la función en los alimentos de mantener la calidad de los alimentos y alargar su vida útil. En la salud, como suplemento evita la formación de especies reactivas de oxígeno y de radicales libres en el organismo. Alimentos ricos en antioxidantes correlacionan bien con una reducción del riesgo de padecer enfermedades coronarias (Pokorny, 2005).

En la actualidad el uso de antioxidantes sintéticos es evitado por los consumidores creándose la necesidad del uso de antioxidantes naturales, una alternativa como fuente de antioxidantes naturales es el uso de aceites esenciales con actividad antioxidante (Miron, *et al.*, 2010). Los aceites de diferentes especies de orégano han demostrado además de actividad antioxidante otros tipos de actividad biológica tales como: antibacteriana, antifúngica, insecticida y nematocida (Arcila, *et al.*, 2004). Para el aceite esencial orégano mexicano (*Poliomintha longiflora* Gray) se reporta mayor contenido de polifenoles totales y la mayor capacidad antioxidante en comparación con 39 hierbas medicinales y culinarias estudiadas en el 2001 (Zheng y Wang, 2001).

En el estado de Nuevo León se reporta de forma endémica la presencia de orégano liso (*Poliomintha longiflora* Gray) en el cual se reportan cantidades importantes de Timol y Carvacrol a las cuales se les atribuye las actividades biológicas favorables como son antioxidantes y antimicrobianas (Aranda *et al.*, 2009).

Sin embargo, el aceite esencial de orégano por su alta volatilidad, olor y sabor dificultan su aplicación directa, por lo que una opción es la microencapsulación a través de emulsiones, lo que además las protegería de su degradación (Parra, 2010).

Por lo antes mencionado el presente estudio tiene como objetivo la estabilización del AEO utilizando el proceso de microencapsulación con esto se logrará ampliar su rango de aplicación y por consiguiente representará así una opción para ser utilizado en la industria.

## 2.0 ANTECEDENTES

### 2.1 Estrés oxidativo

Se define como estrés oxidativo al desequilibrio entre la producción de radicales libres (RL) y la capacidad de un sistema biológico para defenderse (Viada, *et al.* 2017), creando una ruptura en el equilibrio prooxidante-antioxidante a favor del primero.

En condiciones óptimas de salud, los mecanismos de defensa antioxidante endógenos equilibran y neutralizan a los RL. En el metabolismo celular toman lugar reacciones de oxidación-reducción en las que hay transferencia de electrones y pueden generar especies reactivas de oxígeno (ERO), entre los que se encuentran los RL y moléculas derivadas del oxígeno.

En los RL la pérdida de electrones como parte del metabolismo celular, aumenta su reactividad química y generan una tendencia a reaccionar con las moléculas vecinas para captar electrones (comportamiento oxidante), a través de reacciones de óxido-reducción para estabilizarse y producir especies menos reactivas lo que genera perturbaciones en otras moléculas provocando reacciones en cadena (Phaniendra *et al.*, 2015).

La mayoría de los RL provienen de oxígeno o nitrógeno llamándolas como Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) y Especies Reactivas de Nitrógeno. Se conocen además Especies Reactivas de Cloro, Bromo y Azufre (Carvajal, 2019).

Se sabe que los RL tienen efectos biológicos como promotores de un gran número de enfermedades como trastornos cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades inflamatorias y cáncer, entre otras, por otro lado los RL en los alimentos son responsables del deterioro de la parte lipídica (Wojtunik-Kulesza *et al.*, 2016).

A la oxidación de ácidos grasos y triglicéridos presentes en los alimentos se le conoce como rancidez oxidativa o peroxidación lipídica; es una de las más importantes reacciones

que deterioran y afectan de forma importante la calidad y valor nutricional de varios alimentos afectando proteínas, lípidos, y azúcares. La peroxidación puede ser prevenida o retrasada por los antioxidantes, los cuales son sustancias orgánicas de origen sintético o natural que actúan como atrapadores de los RL (Abuashwashu, 2018).

## 2.2 Antioxidantes

### 2.2.1 Definición

Un antioxidante es un componente que retarda o previene la oxidación. Durante la oxidación ocurre transferencia de electrones de una molécula a un agente oxidante (Botsoglou, 2009). Al donar uno de sus electrones los antioxidantes neutralizan a los RL oxidándose ellos mismos (Figura 1).

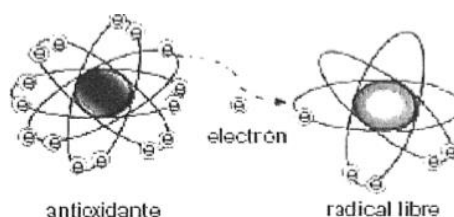


Figura 1. Interacción de antioxidantes con RL (Velásquez, *et al.*, 2004)

En los alimentos se utilizan antioxidantes naturales y sustancias sintéticas estas últimas mayormente utilizadas debido a que son más asequibles de una pureza controlada y de capacidad antioxidante uniforme entre ellos los de mayor uso se encuentra el hidroxibutilanisol (BHA), el butirato de hidrotolueno (BHT) y la terbutilhidroquinona (TBHQ) sin embargo, hay incertidumbre respecto a sus efectos tóxicos y posible acción carcinogénica en la salud humana como animal, por lo que actualmente se buscan reemplazarlos por sustancias de origen natural con actividad biológica antioxidante (Pokorny, *et al.*, 2001; Berdahl, *et al.*, 2010).

### 2.2.2 Clasificación

En función de sus mecanismos de acción los antioxidantes se categorizan como antioxidantes primarios, secundarios o terciarios y por su origen en naturales o sintético (Pokorny, *et al.*, 2001).



### **2.2.2.1 Modo de acción**

Los antioxidantes primarios previenen la formación de RL, transformándolos en sustancias menos dañina por mecanismos de descomposición enzimática, quelando los iones metálicos potencialmente oxidantes por medio de proteínas, y removiendo por acción enzimática la producción de nuevos EROs (Guzmán, 2009).

Los antioxidantes secundarios reaccionan con los RL, evitando reacciones en cadena, existen antioxidantes exógenos provenientes de la dieta como las vitaminas A, C y E; flavonoides, carotenos, etc. que al ser consumidos durante la reacción con los RL, estos deben ser reemplazados. En la Tabla 2 se muestran ejemplos de antioxidantes secundarios clasificados según su origen. Los antioxidantes terciarios son capaces de reparan las moléculas afectadas por los RL. Por ejemplo, enzimas reparadoras de ADN (endonucleasas, exonucleasas) y la metionina sulfóxido reductasa (Velásquez *et al.*, 2004; Guzmán, 2009).

### **2.2.2.2 Origen**

Los antioxidantes de acuerdo con su origen se clasifican en dos grandes grupos: antioxidantes sintéticos y antioxidantes naturales. Los antioxidantes sintéticos permitidos actualmente son el Butil Hidroxi Anisol (BHA), Butil hidroxi tolueno (BHT), galato de propilo (PG), Terbutil Hidroquinona (TBHQ), galato de octilo (OG) y galato de dodecilo (DG) (Makahleh *et al.*, 2015). Los antioxidantes naturales más comúnmente utilizados en los alimentos son vitamina C y sus derivados, tocoferoles, así como ácidos fenólicos y flavonoides (Seppanen, *et al*, 2010; Porras, *et al*, 2009).

## **2.2.3 Efecto de los antioxidantes en la salud**

### **2.2.3.1 Efectos benéficos de los antioxidantes**

Estudios relacionados con los antioxidantes provenientes de la dieta en humanos han mostrado que la ingesta de fresas, espinacas y vino tinto ricos en antioxidantes fenólicos

pueden elevar la capacidad antioxidante del plasma (Reyes, 2008). Los polifenoles del frijol por ejemplo en forma de extracto presentaron efecto protector sobre los índices de lípidos séricos en ratas wistar además de una reducción importante de colesterol total y LDL (Reyes, 2008). En otro estudio con pacientes diabéticos tipo 2, la ingesta de orégano aumentó el metabolismo celular de glucosa y redujo los niveles de colesterol total (Kelble, 2005). Los compuestos fenólicos presentan propiedades como anti-alérgico, anti-aterogénico, antiinflamatorio, antimicrobiano, antioxidante, antitrombótico, cardioprotector y efectos vasodilatadores (Manach, *et al*, 2005).

En los alimentos, los antioxidantes presentes como parte de la composición de los alimentos o la adición de estos intencionalmente retardan o previenen el desarrollo de ranciedad en el alimento y deterioro del sabor generado proveniente de la oxidación, previniendo la aparición de sabores inadecuados (Pokorny, 2001).

#### **2.2.3.2 Efectos no benéficos de los antioxidantes**

Los antioxidantes pueden ser perjudiciales a la salud cuando ejercen un efecto oxidante este efecto depende de la concentración en que son usados (Boudet, 2007). Los antioxidantes al ser agentes reductores pueden desempeñarse como prooxidantes, por ejemplo, la vitamina C tiene efecto antioxidante cuando reacciona con el peróxido de hidrógeno, sin embargo, cuando interactúa con iones de metales se inicia una generación de radicales libres.

#### **2.2.4 Ensayos para evaluar antioxidantes**

Existe un gran número de ensayos para evaluar la capacidad antioxidante total de alimentos, hierbas y extractos vegetales. Sin embargo, un ensayo universal de la actividad antioxidante *in vitro* no ha sido establecido, esto en parte a que la actividad antioxidante va en función de la naturaleza del radical y del procedimiento para generar los radicales por lo que pocos métodos se utilizan comúnmente por las limitaciones que estos presentan

relacionadas con los requisitos metodológicos y la elección de donde se originan los RL (Prior, *et al.*, 2005; Schauss, *et al.*, 2006).

Algunos de los ensayos utilizados para la establecer la actividad antioxidante utilizan la preparación de un radical orgánico o especies reactivas del oxígeno y otros se basan en la oxidación-reducción de iones metálicos (Amorati, *et al.*, 2013).

Los métodos que utilizan radicales como el DPPH y ABTS+ son considerados espectrofotométricos utilizados en la evaluación de alimentos, bebidas y extractos vegetales (Bendini, *et al.*, 2006), son ensayos sencillos y rápidos, sensibles y reproducibles. Los antioxidantes pueden neutralizar los RL por transferencia de átomos de hidrógeno y transferencia de electrones (Prior, *et al.*, 2005; Moon y Shibamoto, 2009).

Otro de los métodos más empleados para medir la capacidad antioxidante en alimentos es el ORAC (Capacidad de Absorción de Radicales Libres) debido a su reconocimiento en el año 2007 y 2010, la USDA (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos) había publicado una base de datos de la actividad antioxidante de 277 alimentos seleccionados utilizando la metodología ORAC, incluso la USDA recomendó una ingesta como unidades ORAC de aproximadamente 3,000 a 5,000 unidades diarias sin embargo dichas recomendaciones fueron retiradas durante el 2012 así como sus listados de ORAC debido a la creciente evidencia de que los valores ORAC no tienen relevancia real para la capacidad antioxidante “*in vivo*” en humanos (Navarro, *et al.*, 2017).

Los métodos utilizados en este trabajo son ampliamente empleados por diferentes investigaciones para determinar el potencial antioxidante de plantas y sus extractos, pero debido a su compleja y diversa composición química, debe evaluarse por dos o más métodos que den pertinencia de la actividad antioxidante presente (Maestri, *et al.*, 2006). Las pruebas seleccionadas para el estudio de la actividad antioxidante se describen a continuación:

### 2.2.4.1 Ensayo DPPH

Este ensayo es sencillo y sensible; el radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) es un radical de nitrógeno orgánico disponible comercialmente, el efecto antioxidante va en función de la desaparición o decoloración del radical DPPH que ejercen las muestras durante la prueba, la coloración del DPPH cambia de púrpura a amarillo debido a la absorción de un átomo de hidrógeno desde el antioxidante esto ocurre en un rango visible, la  $\lambda$  a la que se hacen las lecturas es de 515 nm (Moon y Shibamoto, 2009). La estequiométrica de la reacción es 1:1 con respecto al número de átomos de hidrógeno absorbidos y la actividad antioxidante de la muestra como se muestra en la Figura 2, los resultados se reportan como concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>), refiriéndose a la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración inicial del radical DPPH hasta un 50% y como porcentaje (%) de inhibición del radical DPPH a concentraciones conocidas del antioxidante de prueba así como también como capacidad antioxidante equivalente de Trolox por cada 100 g de muestra (TEAC/100 g) (Huang, *et al.*, 2005).

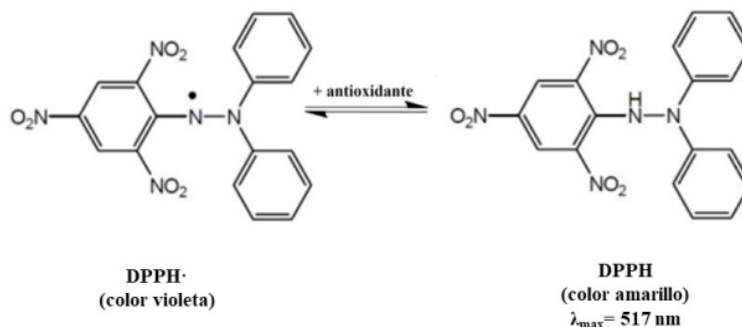


Figura 2. Principio químico del método DPPH (Huang *et al.*, 2005).

### 2.2.4.2 Ensayo ABTS+•

El ensayo ABTS+• (ácido 2,2'-azino-bis-(3- etiltiazolinabencenosulfónico- 6) descrito por Re R. *et al.* (1999), se basa en la capacidad que tienen las sustancias para atrapar radicales. El ensayo se usa en alimentos, compuestos puros o extractos de plantas de comportamiento hidrófilo o lipofílico (Kuskoski, *et al.*, 2005; Re *et al.* 1999). En esta

técnica debe ser generado el catión radical nitrogenado por la oxidación del ABTS con persulfato de potasio (Nenadis, *et al.*, 2004), como se aprecia en la Figura 3.

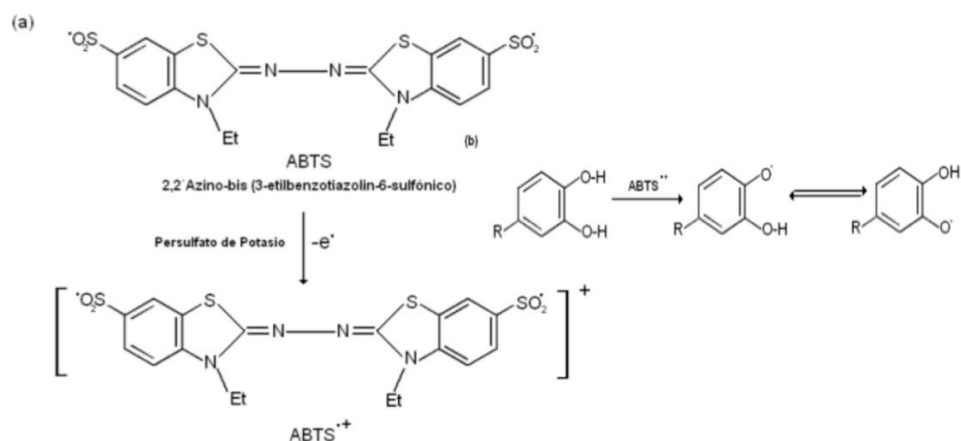


Figura 3. (a) Formación del radical ABTS (b) reacción del catión-radical ABTS<sup>•+</sup> con compuestos fenólicos (Re *et al.* 1999; Nenadis, *et al.*, 2004).

El ABTS<sup>•+</sup> es un cromógeno artificial con una  $\lambda$  max de 752 nm en medio acuoso, y a 713, nm en medio etanólico. El grado de decoloración durante la reacción permite conocer el porcentaje de inhibición del catión radical ABTS<sup>•+</sup> en función de la concentración y el tiempo, y es calculado con respecto a la concentración del Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), los resultados comúnmente se expresan como capacidad antioxidante equivalente de Trolox en micromoles ( $\mu$ mol) por cada 100 g de muestra (TEAC/100 g) (Nenadis, *et al.*, 2004; Branchi, *et al.*, 2005).

Ambos radicales (DPPH y ABTS<sup>•+</sup>), presentan buena estabilidad bajo las condiciones de las evaluaciones y a la vez exhiben importantes diferencias en sus respuestas frente a las muestras con potencial antioxidantes debido en parte a que el radical DPPH es estable y comercialmente disponible y el radical ABTS es preformado por oxidación de ABTS con persulfato de potasio y se tienen que generar los radicales antes de su uso por lo que los radicales formados no son muy estables y los resultados no son reproducibles (Shah y Modi, 2015).

### 2.2.4.3 Ensayo ORAC (Capacidad de absorbancia del radical oxígeno)

Esta técnica permite cuantificar la inhibición del antioxidante producida por el radical peróxilo que induce oxidaciones. Durante la prueba se usa la proteína  $\beta$ -ficoeritrina fluorescente como un sustrato oxidable y AAPH (2 azobis (2 amidino-propano) dihidrocloruro) como productor de radicales peróxilo o radicales hidroxilos como se observa en la Figura 4.

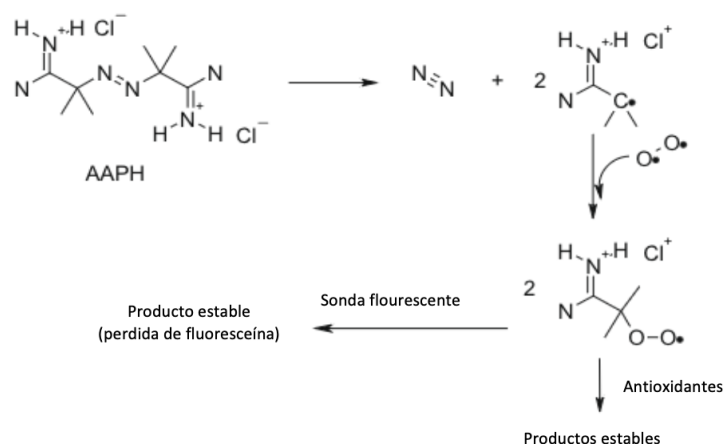


Figura 4. Reacción del radical AAPH durante el ensayo ORAC (Prior, *et al.*, 2005).

Como referencia estándar se usa 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox). Para cuantificar la respuesta se utiliza la técnica de medición del área bajo la curva de descenso de la actividad antioxidante. En la evaluación se combina el porcentaje y periodo de inhibición producido por los antioxidantes de prueba tanto lipofílicos como hidrofílicos (Prior *et al.*, 2005).

El grado de protección frente a la oxidación se reporta en unidades ORAC (1 unidad ORAC = 1  $\mu$ mol de equivalentes Trolox/100 g) y como equivalentes de Trolox (TE) (Huang *et al.*, 2005).

### 2.2.4.4 Ensayo Folin-Ciocalteu

El ensayo de Folin-Ciocalteu espectrofotométrico se utiliza para cuantificar los compuestos fenólicos totales. Se basa en una reacción de oxidación / reducción con el

reactivo Folin-Ciocalteu ( $3\text{H}_2\text{O}-\text{P}_2\text{O}_5\text{13WO}_3-5\text{MoO}_3-10\text{H}_2\text{O}$ : Heteropolianión molibdofosfowolfrámico) en el cual el Mo (VI) es reducido a Mo (V) con un e- donado por un antioxidante.  $\text{Mo (VI) (amarillo) + e- (de AH) } \rightarrow \text{Mo (V) (azul)}$ , La absorbancia del color azul desarrollado se mide a una longitud de onda de 765 nm y los resultados se expresan en equivalentes de ácido gálico/g de muestra (GAE/g) por utilizar ácido gálico como un estándar.

### **2.2.5. Fuentes de antioxidantes**

Los antioxidantes se encuentran en numerosas fuentes del reino vegetal, una de ellas son los aceites esenciales provenientes de plantas y hierbas, de los cuales el aceite esencial de orégano ha sido reportado como fuente importante de antioxidantes (Cueto, 2010).

Como otras fuentes de antioxidantes se ha estudiado la semilla de aguacate y residuos de hojas de borraja, los cuales presentaron una considerable concentración de polifenoles y retraso en la oxidación de las grasas. Así como también se ha estudiado residuos de frutas como la piña, el limón y los subproductos de la agroindustria dándole un valor añadido. De los antioxidantes más estudiados, se encuentran: ácidos fenólicos, flavonoides, terpenos, tocoferoles, fosfolípidos y ácidos orgánicos polifuncionales. También se ha estudiado la influencia del consumo de frutas y vegetales que al contener antioxidantes, como el ácido ascórbico (Vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (Vitamina E) y el  $\beta$ -caroteno sobre la disminución de las enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares y cáncer entre la población (Gallego, 2016).

## **2.3 Orégano**

### **2.3.1 Descripción de orégano**

Es una planta perenne, dicotiledónea del orden Labiales de origen Europeo y Asia occidental su tallo es subterráneo y se ramifica frecuentemente (Alanís, 2008), llega a medir 2 m de altura, la Figura, 5 muestra un ejemplar característico.



Figura 5. Cultivo de Orégano *Poliomintha longiflora* en el estado de Nuevo León

### 2.3.2 Distribución de orégano

El nombre "orégano" taxonómicamente comprende cuatro familias: *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Lamiaceae* y *Verbenaceae*, siendo las dos últimas las más reconocidas (Huerta, 1997). Existe controversia en el número de géneros y especies que se han reconocido bajo este nombre, siendo registradas aproximadamente de 24 a 61 especies, distribuidas en 16 a 27 géneros (García, *et al.*, 2012).

A nivel mundial los principales oréganos de relevancia económica son: el orégano turco (*Origanum onites* L.); griego (*Origanum vulgare ssp.*); español (*Coridohymus capitatus* L.) y el orégano mexicano (*Lippia graveolens*) (Rodríguez, 2014; Aranda, *et al.*, 2009). Ocupando México el segundo lugar como productor mundial de orégano en su mayoría con la especie *L. graveolens* H. B. K.

En México el orégano se desarrolla en las zonas áridas y semiáridas, crece de forma silvestre en los estados del centro de México en Durango, Guanajuato, Jalisco, Querétaro, San Luis Potosí y Zacatecas le sigue en los estados de, Coahuila, Tamaulipas y Nuevo León con la especie *Poliomintha longiflora* llamada orégano liso (García, *et al.*, 2012).

En el estado de Nuevo León se localiza el orégano *Poliomintha longiflora* en diversos puntos de los municipios de Allende, Linares, Mina, Cerralvo, Sabinas, Lampazos, Hidalgo, Monterrey y principalmente en el municipio de Higuera donde se conocen como



hábitat los siguientes puntos de la sierra: Las Rucias, Los Pinos, El Camaján, La Caja Pinta, Infiernillo, Cerritos y Los Picos (Alanís, 2008; Aranda, *et al.*, 2009).

Como segundo productor mundial de orégano, México exporta el 90% de la producción a Estados Unidos siendo la mayoría de las especies de origen silvestres, dado que la producción comercial de orégano mexicano requiere abastecimiento y calidad uniforme, se ha buscado el desarrollo de tecnología para la generación de cultivos competentes lo cual permitirá un manejo eficiente y aprovechamiento integral (Villavicencio *et al.*, 2010; García, *et al.*, 2012).

### 2.3.3 Composición nutritiva de orégano

La bromatológica del orégano reportada por la USDA se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1.- Composición nutritiva del orégano por 100 gramos, Composition of food: spices and herbs: USDA Agricultural handbook 8-2.

Composición	<sup>1</sup> USDA Handbook 8-2
Agua (g)	7.2
Energía (Kcal)	306
Proteína (g)	11
Grasa (g)	10.3
Carbohidratos (g)	64.4
Cenizas (g)	7.2
Calcio (g)	1.6
Fosforo (mg)	200
Sodio (mg)	15
Potasio (mg)	1.7
Hierro (mg)	44
Tiamina (mg)	0.3
Niacina (mg)	6.2
Vitamina A, actividad (RE)	690

### 2.3.4 Contenido y métodos de extracción de AEO

Dependiendo de la especie de orégano así como el estado de salud de la planta, el rendimiento del aceite esencial es variable, cuando se extrae de hojas secas, se ha reportado que varía entre 2% y 7% este porcentaje es influenciado por factores como la altitud así como por la época de recolección (Acevedo *et al.*, 2013; Arcila y Lozano *et al.* 2004; Leyva *et al.* 2017).

Entre los principales métodos de extracción de aceite se encuentra arrastre con vapor, extracción con solventes volátiles y extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico. Las ventajas y limitaciones de los métodos se muestran en la Tabla 2 (Esquivel, 2007; Peredo *et al.*, 2009; Preedy, 2015).

Tabla 2.- Principales métodos de extracción de aceites esenciales

<b>Método de extracción</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Limitaciones</b>
Arrastre con vapor	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Método industrial y de laboratorio.</li> <li>• Buenos rendimientos en aceite extraído.</li> <li>• Obtención del aceite puro, libre de solvente.</li> <li>• Bajo costo.</li> <li>• Tecnología no sofisticada.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Procesos colaterales como polimerización y resinificación de los terpenos.</li> <li>• Hidrólisis de los ésteres.</li> <li>• Destrucción térmica de algunos componentes</li> </ul>
Extracción con solventes volátiles (éter de petróleo, pentano, hexano)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Uso de temperaturas bajas.</li> <li>• No provoca termo destrucción ni alteración química de los componentes del aceite.</li> <li>• Posibilidad de separación de componentes individuales.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Costoso.</li> <li>• Contaminante del ambiente.</li> <li>• Riesgo de incendio y explosión.</li> <li>• Difícil de separar completamente el solvente sin alterar la composición del aceite.</li> <li>• Co-extracción de ácidos grasos, ceras y pigmentos.</li> </ul>
Extracción con CO <sub>2</sub> supercrítico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alto rendimiento.</li> <li>• Ecológicamente limpio.</li> <li>• Fácil retiro y reciclaje del CO<sub>2</sub>.</li> <li>• Bajas temperaturas de extracción.</li> <li>• No hay alteración química del aceite.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ácidos grasos, pigmentos y ceras también pueden ser extraídos junto con el aceite esencial.</li> <li>• Alta inversión inicial</li> </ul>

- 
- Cambiando parámetros operacionales se puede cambiar la composición del aceite extraído.
- 

### 2.3.5 Composición de AEO

Actualmente hay numerosos estudios sobre el orégano y composición química de su aceite esencial, se ha identificado más de 50 compuestos, se ha identificado que los principales compuestos del aceite de orégano son dos fenoles isoméricos, carvacrol o fenol no-cristalizable (-isopropil-2-metilfenol) y timol fenol cristalizable (5-metil-2-isopropilfenol) los cuales pueden constituir el 65.8-77.3% del AEO estos se presentan en diferentes relaciones; por ejemplo en el género *Lippia* el carvacrol se presenta en un 13 % mientras que el timol un 12.5 %, aunque se ha cuantificado también hasta un 55 % de carvacrol por otro lado en el género *Poliomintha* el contenido de carvacrol puede llegar hasta un 18% mientras que en especies como *O. onites* es de 29.6 % y *O. minutiflorum* es de 56.1%, los niveles de timol también son variables en estas especies de 17.1 % y 2.9% respectivamente (Erler y Cetin, 2009; Rivero *et al.*, 2011).

Se han reportado contenidos de timol superiores al 30% en orégano (*L. graveolens Kunth*) procedentes del estado de Jalisco y en el aceite esencial de *Lippia graveolens* HBK contenidos de carvacrol de 71% y timol 5% (Arcila , *et al.*, 2004), por otro lado dependiendo de la parte de la planta como las hojas, en *Lippia origanoides* se ha encontrado carvacrol + timol 53.2%,  $\rho$ -cimeno 10.1%,  $\Upsilon$ -terpineno y trans- $\beta$ -cariofileno 3.4 % (Muñoz, *et al.*, 2007), en cambio en las flores de orégano de la misma especie los componentes más abundantes identificados fueron carvacrol 42.5%,  $\rho$ -cimeno 9.8%,  $\Upsilon$ -terpineno 8.9%, y timol 6.7%. Sin embargo, los niveles de estos componentes aumentan cuando las plantas son sometidas a condiciones de estrés (Rivero *et al.*, 2011).

Algunos autores han indicado que la inestabilidad en la composición química de los aceites esenciales proviene primeramente al origen de la planta y después a la influencia del medio ambiente. Otros investigadores atribuyen mayor efecto al medio ambiente, como la densidad de planta sembrada, temporada de cosecha, suministro de agua así como

la cantidad de luz (Ozkan, *et al.*, 2010; Arcila, *et al.*, 2004). La Figura 6 presenta las estructuras químicas de algunos de los compuestos principales presentes en el orégano (Arcila *et al.*, 2004).

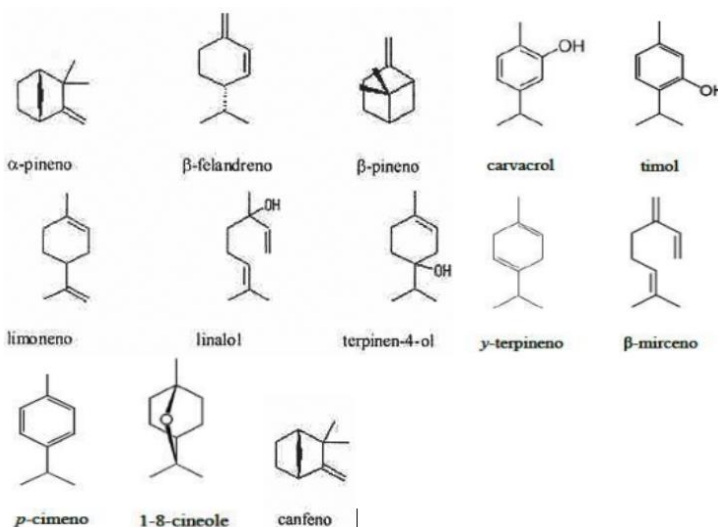


Figura 6. Estructuras químicas de los principales compuestos presentes en el orégano

### 2.3.6 Actividad biológica de aceites esencial de orégano

#### 2.3.6.1 Antioxidante:

El efecto antioxidante del AEO es una de las principales actividades biológicas y es debida a la presencia de grupos hidroxilo presente en los fenoles timol y carvacrol (Granados *et al.*, 2014). Se estima que la actividad antioxidante del aceite esencial de orégano están relacionada en parte con los mecanismos que ejercen su efecto sobre el estrés oxidativo, algunos mecanismos son: actividad de eliminación de radicales libres, modulación de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa) y la inhibición de la prooxidación (Leyva *et al.*, 2017).

Varios investigadores reafirman el potencial antioxidante de los aceites esenciales provenientes de diferentes variedades de orégano (Arcila *et al.*, 2004; Leyva *et al.*, 2017). Zheng y Wang en el 2001 de entre 39 plantas de uso culinario y medicinal entre ellos el orégano, tomillo, valeriana, romero, mejorana entre otras demostraron que el orégano mexicano (*Poliomintha longiflora* Gray) tuvo la mayor capacidad antioxidante de entre las plantas estimada por el método ORAC y similar capacidad que el antioxidante sintético

de referencia BHA de uso en alimentos. Así mismo en especies de orégano *O. x majoricum*, *O. vulgare ssp. vulgare* y *ssp. Hirtum* mediante el ensayo ABTS presentaron valores entre 0.234 y 0.163 mmoles Trolox / mg de aceite esencial de orégano (Asensio *et al.*, 2015). Adicional a esto en aceites esenciales de 51 plantas silvestres de *Origanum ssp.* recolectado de diferentes áreas de Sicilia mostró un (IC<sub>50</sub>) de 3.81 a 11.05 µg / mL. que inhibe el 50% de la peroxidación inducida por la radiación UV en membranas liposomales (prueba UV-IP) (Tuttolomondo *et al.*, 2014).

Estas propiedades antioxidantes brindan la oportunidad de hacer uso del aceite esencial de orégano como conservantes y saborizantes para alimentos o productos nutracéuticos. (Arcila *et al.*, 2004; Leyva *et al.*, 2017).

#### **2.3.6.1.1 Aplicaciones como antioxidante en la salud y aditivo en alimentos**

Se ha estudiado la aplicación del aceite esencial de *O. vulgare* L. como antioxidante en margarina y en yema de huevo con buenos resultados, también los extractos obtenidos con etanol y cloroformo han evitan la oxidación y el deterioro del color en piezas de carne de cerdo (Cueto, 2010). Se ha incursionado en la fabricación de películas biodegradables con extracto de orégano, como capa protectora a los alimentos que al ingerirlos se convierte en una fuente de antioxidantes al organismo (Olimpia, *et al.*, 2005).

En matrices de pastas cárnicas que contienen ácidos grasos insaturados se ha estudiado el efecto protector contra la oxidación del orégano, y concluyeron que los extractos de orégano presentaron actividad antioxidante similar al control y que pueden satisfacer la demanda de aditivos naturales (Hernández, *et al.*, 2009).

Sus aplicaciones se extienden a los aceites vegetales como el aceite de soya y aceite de oliva sin refinar, donde se evaluó el AEO de *Lippia berlanddieri Schauer* al 0.15% y 0.3% como aditivo antioxidante, los aceites almacenaron a 60 grados durante 45 días, como control positivo se utilizó BHT al 0.02%. El aceite de orégano al 0.3% mostró efectividad significativa en la reducción de la oxidación reflejada en sus valores de

peróxidos (Chaquilla, *et al.*, 2008). También en aceite de maní el aceite esencial de orégano aplicado al 0,1% presentó una actividad antioxidante similar a la del BHT al 0,02%, indicando que este compuesto puede reemplazar a un antioxidante sintético. Sin embargo, sus aplicaciones industriales son limitadas debido al aroma y sabor que transferibles a los alimentos donde se aplicarían, por lo que se requiere de investigación en el proceso de deodorización (Olmedo, *et al.*, 2009).

### **2.3.6.2 Actividad Antimicrobiana:**

Se ha encontrado que los aceites esenciales de las especies de orégano además de la actividad antioxidante presentan actividad contra bacterias gram negativas como *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica* y *Enterobacter cloacae* y las gram positivas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus subtilis*, también presenta actividad fungicida (Arcila *et al.*, 2004; Ortega *et al.*, 2011).

Otras actividades biológicas importantes reportadas del aceite esencial de orégano son; antibiótico antiparásito, estrogénica e insecticida (Arcila *et al.*, 2004; Traesel, 2010; Singletary, 2010).

## **2.4 Emulsiones**

### **2.4.1 Generalidades de emulsiones**

Las emulsiones tienen la función de actuar como un vehículo de dispersión, dispersando a las moléculas que son insolubles en matrices hidrofílicas, haciendo posible el suministro de estas moléculas, en su aplicación en alimentos estos actúan como sistemas acarreadores, encapsulantes, y protectores de compuestos bioactivos susceptibles a procesos oxidativos, sistemas de liberación controlada así como moduladores de las propiedades reológicas y atributos organolépticos en los alimentos.

Por ejemplo, se han emulsionado aceites esenciales, moléculas hidrofóbicas como agentes enturbiantes, vitaminas liposolubles, colores naturales y antioxidantes para diversificar su dispersión, lograr su aplicación, aumentando así su estabilidad y funcionalidad (Espinosa y García 2017).

En sus aplicaciones más destacadas, podemos encontrar la encapsulación de compuestos polifenoles, la encapsulación puede ser líquida o en polvo, puede también ser combinados con otras sustancias como aceites poliinsaturados, para conseguir sinergismo en la actividad antioxidante. Por lo que la protección a través de emulsiones puede aumentar su estabilidad conservando sus propiedades funcionales (Watson, 2013; Huang, 2010).

Las emulsiones son sistemas coloidales con fases líquidas inmiscibles entre sí, conformadas por una fase dispersa, una fase continua y una interfase llamada membrana interfacial. Cuando las emulsiones son de aceite en agua (O/W), el aceite es la fase dispersa mientras que la fase continua es la acuosa, y cuando las emulsiones son de agua en aceite (W/O), el agua es la fase dispersa mientras que la fase continua es la oleosa (Espinosa y García 2017).

En una emulsión las moléculas se dispersan en función con su concentración y polaridad, las moléculas polares son afines para situarse en la fase acuosa, mientras las moléculas no polares a la fase oleosa, y las moléculas anfifílicas toman lugar en la interfase. Como ejemplo ilustrativo de una emulsión de aceite en agua (O/W), el aceite en forma de gotas actúa como fase dispersa y se distribuyen en el agua que actúa como fase continua y la interfase se sitúa entre la fase como se observa en la Figura 7. La energía que libera la interfase en las emulsiones los convierte en sistemas termodinámicamente inestables (Báez, 2008; Freire, 2017).

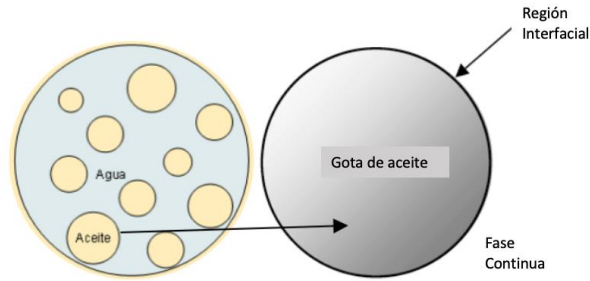


Figura 7. Emulsión (O/W) aceite como fase dispersa y agua como fase continua y región interfacial (McClements, *et al.*, 2005)

### 2.4.2 Inestabilidad de emulsiones

Los fenómenos de inestabilidad que afectan a las emulsiones son: cremado y sedimentación provocados por efectos gravitacionales debido a la diferencia de densidad de las fases inmiscibles, estos procesos son reversible y una manera de prevenirlo es reduciendo estas diferencias. La inestabilidad consiste en un movimiento ascendente de las gotas de aceite, principalmente porque la densidad es menor que el líquido acuoso que los contiene; mientras que la sedimentación ocurre cuando las gotas de aceite tienen densidad mayor que el medio que los contiene, y sedimentan. (Espinosa y García 2017).

Otras formas de inestabilidad son la floculación y coalescencia (Figura8), que consisten en la agregación de los glóbulos de la fase dispersa y la floculación se presenta cuando se unen 2 o más gotas conservando su forma y dimensión individual, mientras que la coalescencia es ocasionada al fusionarse al menos 2 gotas y formando una de mayor tamaño, la continuidad de la inestabilidad lleva al rompimiento de la emulsión (Ramos, *et al.*, 2009).



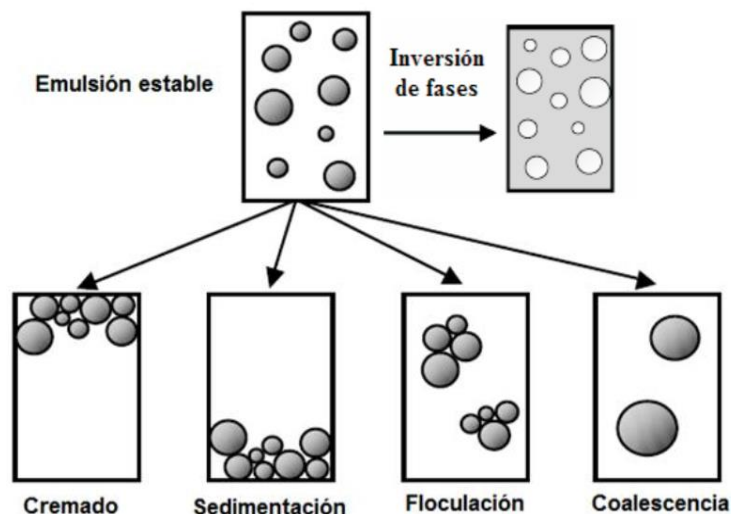


Figura 8. Procesos físicos de inestabilidad de las emulsiones.

Una forma de observar la inestabilidad por estos procesos es a través de su distribución de tamaño de las gotas en la emulsión con respecto al tiempo (Fabela, *et al.*, 2017; McClements, *et al.*, 2004). A continuación la descripción de los principales mecanismos de inestabilidad en emulsiones.

#### 2.4.2.1 Cremado

El cremado en emulsiones de tipo aceite en agua, se genera por efecto de gravedad provocando un desplazamiento de las gotas hacia la superficie. El efecto está dado por tamaño de glóbulo de aceite y por diferencia de densidad entre las fases involucradas. En tamaño de partícula, el cremado se presenta en valores mayores a 200 nm de diámetro. En la sedimentación el proceso es inverso. Se ha observado que la velocidad de cremado decrece exponencialmente como incrementa la fase dispersa en fracción volumétrica o másica (Fabela, 2017).

#### 2.4.2.2 Floculación

Cuando las gotas dentro de una emulsión se asocian por fuerzas de atracción neta interpartícula ocurre la floculación. En el proceso está involucrada la fuerza de atracción entre

las gotas y la fracción volumétrica y está controlado por las fuerzas electrostáticas de van der Waals, y repulsivas. La floculación es lo primero que ocurre debido al efecto de la gravedad en las emulsiones con bajo valor de  $\phi$ , es decir, el empaquetamiento entre las gotas dispersas es bajo. En consecuencia, son emulsiones diluidas, y tienen un tiempo de vida de anaquel reducido (McClements, *et al.*, 2004; T. F. Tadros, 2009).

#### **2.4.2.3 Coalescencia**

La coalescencia de gotas de aceite es ocasionada por la fusión de 2 más gotas de aceite convirtiéndose una de mayor tamaño. La coalescencia es difícil de identificar pues esta ocurre durante los cambios de distribución de las gotas de aceite cuando se presenta cremado, floculación, e inversión de fase (McClements, *et al.*, 2004).

La estabilidad de una emulsión depende de la estructura molecular del tensioactivo, que determina la resistencia de la película interfacial, morfología de las gotas de aceite en el medio continuo, fracción volumétrica menor y mayor fracción de fase continua, la existencia de estructura tipo gel, que garantiza la alta estabilidad contra la coalescencia y por la modificación de proteínas o polisacáridos en su estructura (Espinosa y Garcia, 2017).

#### **2.4.2.4 Inversión de fases**

La inversión de fase ocurre cuando en una emulsión la fase dispersa se convierte en la fase continua y viceversa. Dependiendo de la matriz en la que ocurra puede ser de beneficio o indeseable pues afecta la textura y estabilidad. Cuando se presenta la inversión de fases también ocurre la floculación y coalescencia. Durante este proceso pueden existir emulsiones aceite en agua, agua en aceite, emulsión múltiple y fases bi-continuas (McClements, 2004; Piorkowski y McClements, 2014).

### **2.4.3 Emulsionantes y estabilizantes**

Las emulsiones por su naturaleza son sistemas termodinámicamente inestables, pero es posible producir emulsiones cinéticamente estables (metaestables) por un periodo de tiempo definido con duración de algunos días, semanas, meses, o años esto es posible a través del uso de sustancias emulsionantes.

Los agentes emulsionantes se adsorben en la superficie de las gotas y se clasifican en función de sus propiedades eléctricas en: iónicos, no iónicos y bipolares, su aplicación reduce la energía libre del sistema disminuyendo la tensión interfacial entre la fase dispersa y continúa aportando estabilidad a la emulsión.

En la formulación de emulsiones se utilizan emulsionantes y estabilizantes, el agente emulsionante por acción interfacial promueve la formación de emulsiones y la estabiliza en corto tiempo. Un agente estabilizante aporta estabilidad a la emulsión a largo plazo, posiblemente por adsorción (McClements, 2005; Espinosa y García, 2017).

Los estabilizantes cuando son biopolímeros de proteína o polisacárido que al adsorberse en interfases aceite-agua crean capas estables alrededor de las gotas de aceite, y actúan como emulsionantes y estabilizantes. A continuación se describen algunos emulsionantes y estabilizantes como los exudados de gomas que son polisacáridos naturales los cuales son usados en diferentes aplicaciones en la industria debido a sus características emulsionantes y estabilizantes (Espinosa y García, 2017).

#### **2.4.3.1 Goma Arábica**

La goma arábica (GA) de naturaleza aniónica con características de baja viscosidad y solubles (aprox. 500 g/L) es de las gomas que más aplicaciones tiene en la industria de los alimentos y farmacéutica. Se obtiene del exudado de la corteza del árbol *Acacia senegal* y *Acacia seyal* su peso molecular es situado entre 250000 g/mol y 580000 g/mol. Una de las mayores aplicaciones en la industria de alimentos es como emulsificante de

saborizantes de base oleosa así como en refrescos por sus propiedades estabilizantes que permanecen a pH 3.5 (Espinosa y García, 2017; Freire, 2017),

La GA en su composición contiene un complejo arabinogalactana-proteína la cual ha sido reportado de ser responsable de las propiedades emulsificantes y estabilizantes de la goma arábica, este complejo representa del 10-20% del total de la goma, esa es la razón por la cual una alta proporción de goma en aceite son necesarios para generar una emulsión estable. La adsorción de GA sobre una gota de emulsión produce una membrana interfacial gruesa y cargada negativamente que estabiliza la emulsión a través de interacciones estéricas y electrostáticas (Ramos, 2009; Freire, 2017).

#### **2.4.3.2 Goma de mezquite**

La goma de mezquite (GM) es el exudado proveniente del árbol de mezquite (*Prosopis leavigata*) y al menos 10 especies se localizan en México. La GM de naturaleza aniónica, es una sal neutra de un polisacárido ramificado lo que genera una conformación molecular con alta solubilidad en agua. Además de los componentes polisacáridos, la goma de mezquite tiene una fracción proteica que oscila entre 2 y 6% (Sibaja, 2015).

La goma de mezquite es un emulsionante que forma películas viscoelásticas visibles en la interface aceite-agua, que confiere una estabilidad a largo plazo, debido a factores estéricos y electrostáticos. Se ha reportado que en la encapsulación de pigmentos brinda una mejor estabilización y protección contra la degradación de pigmentos que la goma arábica (Báez, 2008).

#### **2.4.3.3 Quitosano**

El quitosano (Q) es un polímero natural de carácter catiónico que se obtiene a partir de la quitina con aplicaciones en la industria alimentaria y biotecnológica. La quitina está formada por unidades de 2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucosa unidas por enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4).

Sus propiedades funcionales son determinadas por su grado de desacetilación y su peso molecular así como el porcentaje de grupos amino libres que tienen relación con su grado de solubilidad (Espinosa y García, 2017; Báez, 2008).

Algunas de las propiedades funcionales del Q son: biodegradabilidad, biocompatibilidad, mucoadhesión promoviendo la absorción, actividad antimicrobiana, antiolesterolémica, capacidad filmogénica, hemostático y antioxidante (Espinosa, *et al.*, 2007; Sibaja; 2015).

#### **2.4.4 Método de deposición capa por capa (DCC) para preparación de emulsiones**

A través de la ingeniería interfacial se ha buscado incrementar la estabilidad de las emulsiones, se sabe que la membrana interfacial no permite la transferencia de compuestos prooxidantes limitando la interacción de los compuestos solubles en el agua con peróxidos lipídicos, oxígeno, iones metálicos y luz. En la estabilidad de la emulsión también influye el pH, la carga superficial y el espesor de la membrana interfacial (McClements, 1999; Espinosa y García, 2017).

Un método que se ha desarrollado para modificar las propiedades de la membrana interfacial es el método de deposición electrostática capa por capa (DCC) que tiene efectos sobre la composición química, espesor, carga eléctrica, permeabilidad (propiedades difusivas) y sus propiedades reológicas (McClements, 2004). Originalmente este método se utilizó para cambiar la carga eléctrica en una emulsión, ya que puede combinar los efectos de varios emulsionantes para desarrollar emulsiones de mayor estabilidad, por ejemplo, para formar una primera capa adsorbida en la interfase se puede usar una goma aniónica y después un biopolímero catiónico para formar una capa secundaria. El resultado será una emulsión con una mejor estabilidad física, brindando además una mayor protección contra la degradación de lípidos (Klinkesorn y McClements, 2009; McClements, 2004).

### 2.4.5 Microencapsulación

Para preservar y proteger algunas sustancias bioactivas como sabores, vitaminas o aceites esenciales se utilizan procesos de microencapsulación en los cuales las sustancias de interés son introducidas en un material pared, durante este proceso los sólidos o líquidos son empacados en cápsulas de dimensiones que pueden ser de 1  $\mu\text{m}$  hasta 5000  $\mu\text{m}$  que en condiciones específicas son capaces de liberar controladamente su contenido (McClements, 2014).

Los procesos de microencapsulación permiten que los aceites esenciales se incorporen en una matriz, para producir y proporcionar un polvo seco. Al microencapsular los aceites esenciales se busca minimizar su pérdida, estabilizarlos y protegerlos durante el almacenamiento, reducir la tasa de evaporación, así como controlar la velocidad de liberación, también se desea mejorar la compatibilidad con otros componentes en las formulaciones, prolongar la vida útil del producto microencapsulado y facilitar la manipulación (Fabela, 2017).

Los procesos de producción de microcápsulas suelen ser físicos y uno de los principales es el secado por aspersión, procesos químicos por inclusión molecular y polimerización interfacial y procesos fisicoquímicos a través de coacervación simple o compleja y atrapamiento en liposomas. En la industria alimentaria es común el uso de secado por aspersión ya que produce partículas de buena calidad y tiene como ventaja procesos flexibles, es económico y de fácil disponibilidad de equipos (Jiménez, *et al.*, 2009).

Para la obtención de microcápsulas es importante la etapa de preparación y formulación de la emulsión, ya que definirá las características y funcionalidad de la microcápsula para posteriormente secarla.

En estudios donde se han obtenido microcápsulas de aceite poliinsaturados a partir del secado por aspersión de emulsiones elaboradas con el método de deposición electrostática capa por capa, la estabilidad física y oxidativa del aceite microencapsulado fue mayor,

comparado contra el mismo aceite sin encapsular. También se ha demostrado que al secar por aspersión una emulsión sencilla y una emulsión por DCC, esta última es más estable contra la oxidación de los lípidos (Espinosa y García, 2017).

#### **2.4.5.1 Método de Secado por aspersión**

El secado por aspersión es una operación unitaria donde toma lugar la transformación de un fluido para obtener una sustancia sólida, atomizándolo en forma de microgotas en un ambiente de secado, produciendo un polvo hecho de pequeñas esferas, este método es ampliamente utilizado para la protección de compuestos bioactivos (Fabela, 2017).

Consiste como primera fase en emulsificar el material a encapsular utilizando biopolímeros como material de pared estos pueden ser almidones modificados, maltodextrinas y las gomas. La segunda fase es el secado, en el cual se formará una fina y densa capa protectora que evitara mecanismos difusivos, el objetivo de este proceso es la obtención de un polvo. La sustancia que se desea encapsular es homogenizada con el material de pared formando una mezcla, la cual es alimentada al secador por aspersión y se atomiza por medio de una boquilla y al contacto con aire caliente a contracorriente el agua se evapora instantáneamente permitiendo que el material activo quede atrapado en el material de pared (Fabela, 2017; Ramos, 2009).

Al contenido interior de las microcápsulas obtenidas se les denomina núcleo, fase interna, relleno o agente activo y a la capa de protección, material portador, coraza, capa, red, matriz o material de pared. Durante el secado por aspersión, las características del material y las condiciones de operación pueden modificar el desarrollo morfológico de la microcápsula, presentando morfoestructura lisa, con hendiduras y cierto grado de esfericidad y circularidad. La naturaleza del material de pared usado tendrá importante influencia sobre el proceso de secado, así como en las propiedades y estabilidad de las microcápsulas resultantes (Torrenegra, *et al.*, 2014).

Existe una extensa gama de materiales de pared en el mercado de alimentos donde se incluyen proteínas, aceites hidrogenados, ceras, maltodextrinas, almidones y gomas; estos materiales deben tener la capacidad de producir emulsión estable y que no reaccione durante el proceso o en el almacenamiento entre otras características (Ramos, 2009). a continuación se describen algunos compuestos empleados como materiales de pared.

La GA es versátil para la mayoría de los métodos de microencapsulación, al mezclarse con aceites esenciales tiene la capacidad de formar emulsiones estables y con una baja viscosidad ( $< 0.500$  Pa.s.), además, proporciona buena retención de sustancias volátiles y confiere protección efectiva frente a la oxidación lo cual es deseable en el secado por aspersión.

El uso de aditivos coadyuvantes del secado con propiedades inertes como almidón y maltodextrina (MD) facilitan la recuperación del producto. La maltodextrina es un oligosacárido y tiene propiedades de baja viscosidad a altas concentraciones de sólidos, alta solubilidad, inodoras e incoloras con un peso molecular promedio de  $1800$  g/mol, es reconocida por la FDA como sustancia GRAS (Generally Recognized As Safe) (Parra, 2010; Flores, 2017).

La mezcla de goma arábiga y la maltodextrina permite la posibilidad de adicionar significativas cantidades de maltodextrinas logrando un aumento en los sólidos sin afectar de manera relevante la viscosidad final del sistema (Lopez *et al.*, 2009).

Actualmente, el secado por aspersión es ampliamente empleado en la industria alimenticia, farmacéutica y química debido a que es un método efectivo para la protección y conservación de compuestos bioactivos (Flores, 2017).



### 3.0 JUSTIFICACIÓN

Recientemente se ha incrementado la búsqueda de antioxidantes de origen natural para ser usados en alimentos como aditivos, y en la salud como suplementos para reemplazar los antioxidantes sintéticos debidos a las restricciones de carcinogenicidad que estos presentan, el aceite esencial de orégano *Poliomintha longiflora* Gray como recurso botánico de la región es una buena fuente de antioxidantes, atribuida por los altos contenidos de monoterpeno, principalmente carvacrol y timol. Sin embargo, un obstáculo para diversificar su aplicación es la alta inestabilidad que presentan los monoterpenos, ya que estos son fácilmente oxidados. Por lo que utilizar la tecnología de encapsulación se considera como una opción factible para reducir la degradación de los antioxidantes del orégano.

## **4.0HIPÓTESIS**

Se puede obtener un producto antioxidante de aceite esencial de orégano *Poliomintha longiflora* Gray encapsulado en emulsiones, con aplicación en alimentos.

## **5.0 OBJETIVO GENERAL**

Obtención y evaluación de un producto antioxidante emulsificado estable a partir de aceite esencial de orégano *Poliomintha longiflora* Gray con concentraciones conocidas de carvacrol y timol.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Obtener aceite esencial de orégano por arrastre de vapor
- Caracterizar fisicoquímicamente el aceite esencial de orégano obtenido
- Determinar la concentración de polifenoles totales y capacidad antioxidante del aceite esencial de orégano obtenido
- Cuantificar la concentración de carvacrol y timol del aceite esencial por cromatografía de gases
- Obtener con el aceite esencial de orégano una emulsión estable utilizando goma de mezquite, arábica y quitosano
- Evaluar el uso del aceite de orégano como aditivo antioxidante en emulsiones de aceite de linaza

## 6.0 MATERIAL Y MÉTODOS

Se trabajo con orégano colectado en tres diferentes estadios del año (invierno, verano y otoño) de dos diferentes composiciones de la planta, 100% hoja (Hoja) y otra de composición hoja:caliz relación 82:18 % (Mixto) a estas muestras se realizó extracción de AEO usando arrastre de vapor, se determinó el contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante por ensayos ORAC, ABTS, y DPPH. Se cuantifico carvacrol y timol por cromatografía de gases (GC). Posteriormente para evaluar el AEO como antioxidante se utilizó a diferentes dosis para proteger de la oxidación al aceite de linaza (AL) emulsionado con goma arábica (GA), goma de mezquite (GM) y quitosano (Q). Y para la obtención de microcápsulas de AEO, se elaboraron emulsiones para secado por aspersion utilizando GA y Q a las cuales se les midió antes y después la actividad antioxidante (AA) y contenido de timol y carvacrol. El cumplimiento de los objetivos se realizó como se muestra en la Figura 9. Todas las determinaciones se realizaron por al menos triplicado.

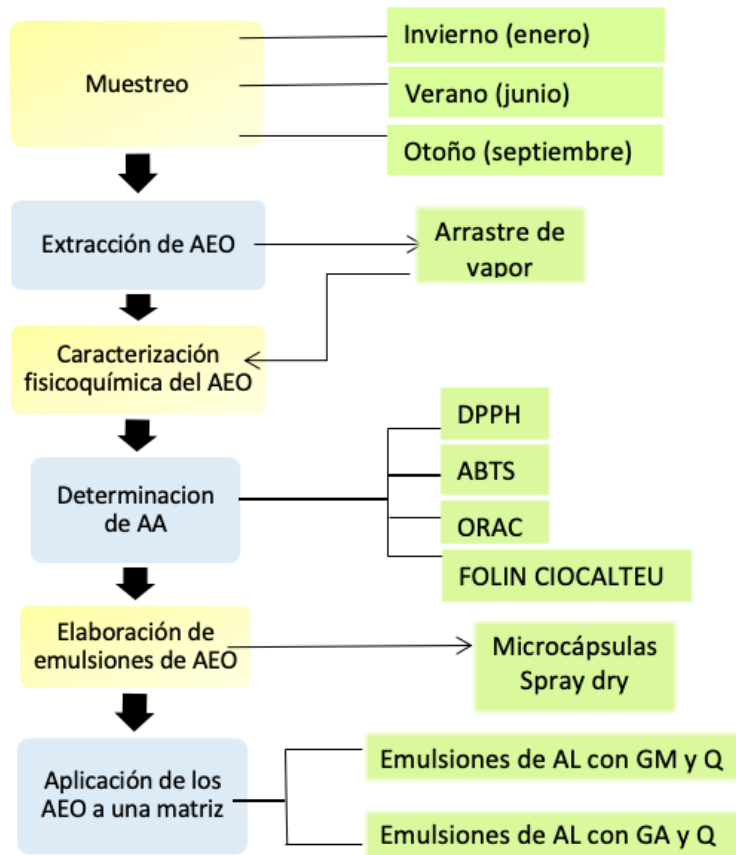


Figura 9. Diagrama general de flujo de la investigación.

## **6.1. Muestreo y obtención de material biológico.**

Las plantas cultivadas de orégano *Poliomintha longiflora* Gray se obtuvieron del municipio de Higuera Nuevo León. Las coordenadas del sitio son latitud: 25°58'20.88" N, longitud: 100°0'54.00"0

El material vegetal utilizado en este trabajo corresponde a la parte aérea de *Poliomintha longiflora* Gray durante el invierno, verano y otoño del 2012. Los ejemplares fueron autenticados por Dr. Glafiro Alanís Flores (Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León).

## **6.2. Extracción del aceite esencial de orégano (AEO)**

La extracción se realizó por arrastre de vapor, con el orégano seco se formó un lecho fijo compactado. La generación del vapor de agua fue interna (base del recipiente). Conforme el vapor entra en contacto con el lecho, el orégano seco se calienta liberándose el aceite esencial, debido a su volatilidad será arrastrado por el vapor de agua, AEO y vapor de agua fluyen hacia un condensador, donde la mezcla es condensada en un cleveger enfriada a temperatura ambiente, el AEO es recuperado y secado con sulfato de sodio anhidro y almacenados en viales ámbar en congelación hasta su uso (Alizadeh, *et al.*, 2014).

## **6.3. Caracterizar fisicoquímicamente el aceite esencial de orégano obtenido**

### **6.3.1 Porcentaje (%) de rendimiento del aceite esencial de orégano**

El rendimiento del aceite esencial de orégano se determinó a través de la siguiente ecuación 1.

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{g de aceite esencial}}{\text{Peso en gramos del material vegetal}} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

### 6.3.2 Densidad de aceite de orégano

La densidad del aceite se determinó a través de un picnómetro, con la ecuación 2:

$$P = \frac{\text{Masa}}{\text{Volumen}}$$

Ecuación 2

### 6.3.3 Índice de refracción

Para la determinación del índice de refracción del aceite esencial de orégano, se utilizó un refractómetro Abbemat 300 (Anton paar, Austria) de acuerdo con Granados *et al* 2014.

## 6.4.- Determinación de la concentración de polifenoles y capacidad antioxidante del AEO

### 6.4.1 Ensayo Folin–Ciocalteu

Los fenoles totales (FT) se determinaron mediante el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu el fundamento del ensayo es la transferencia de electrones de la sustancia antioxidante a evaluar al molibdeno presente en el reactivo Folin-Ciocalteu, produciéndose un complejo azulado que exhibe una absorbancia máxima a 750-765 nm. El ácido gálico es utilizado como compuesto de referencia (Singleton, *et al.*, 1999). Se preparó una disolución patrón de 100 mg/L de ácido gálico a partir de esta disolución se prepararon concentraciones de 1, 2, 3, 4 y 5 ppm, se preparó una solución de carbonato de sodio al 20% en agua destilada y se llevó a ultrasonido hasta su completa disolución. Aparte, se preparó una disolución 1 N del reactivo de Folin Ciocalteu en agua destilada; el reactivo se protegió de la luz y se colocó en refrigeración hasta su uso. De los aceites esenciales diluidos en metanol se prepararon soluciones con concentraciones de 20, 30, 40, 50 y 60 ppm se tomaron de cada muestra 100 µl y se añadieron 100 µl del reactivo de Folin Ciocalteu posteriormente se dejó en reposo 5 minutos. Transcurrido el tiempo se adicionaron 300 µL de la disolución de carbonato de sodio al 20 % y se llevó a un volumen final de 2 ml con agua destilada. La absorbancia se leyó a las 2 horas de reacción a una longitud de onda de 760 nm. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico/g (mgGAE/g) de AEO.

### 6.4.2 Ensayo del radical DPPH

La actividad antioxidante de las muestras fue evaluada como la capacidad de atrapar o inhibir el radical DPPH (2,2'-difenil-1-picrylhidrazil) por medio de la disminución de la absorbancia leída cada 30 minutos hasta obtener la estabilización de la reacción a una longitud de onda de 517nm (Mimica, *et al.*, 2010) y (Da Porto, *et al.*, 2000) con algunas modificaciones. El aceite de orégano se diluyó en etanol para obtener concentraciones de 100, 300, 500, 800, 1200 y 1500 ppm y de cada concentración se tomaron 250 µl y se adicionaron 750 µl de una solución etanólica al 0.1 mM de DPPH. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro Génesis 5 Spectronic y se calculó el % de inhibición usando la ecuación 3:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Abs. Blanco} - \text{Abs. Muestra}}{\text{Abs. Blanco}} \times 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

Para la determinación de la IC<sub>50</sub> o concentración de aceite esencial de orégano necesaria para neutralizar en un 50% el DPPH, esta se calculó a partir de los porcentajes de inhibición del DPPH obtenidos de las diferentes concentraciones de las soluciones de orégano, los valores de IC<sub>50</sub>, se determinaron mediante la ecuación de regresión lineal.

### 6.4.3 Ensayo ORAC

La determinación de capacidad antioxidante total se realizó en base a la metodología descrita por Prior *et al.* (2003) con ligeras modificaciones. Se realizaron curvas de calibración con ácido 6-Hidroxi-2,5,7,8- tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), en un intervalo de concentraciones de 6.25-100 µM en buffer de fosfato 75 mM (pH 7.4). Los resultados de capacidad antioxidante fueron expresados en unidades ORAC (1 unidad ORAC equivale a 1µmol TE/100g) (Davalos, *et al.*, 2004). Las determinaciones se realizaron en una microplaca de 96 pozos. Se colocaron en cada pozo 25 µL de estándar de Trolox o muestra de aceite de orégano diluida en metanol, se agregaron 150 µL de fluoresceína 0.02 µM (Huang, *et al.*, 2005) y se incubaron en oscuridad a 37 C durante 20 min. Una vez transcurrido este tiempo, se agregaron 25 µL de dihidrocloruro de 2,2-Azobis-2-metilpropionamida (AAPH) 153 mM, se agitó y se midió la fluorescencia en

un lector de microplacas BioTek™ modelo Synergy 2, las lecturas se realizaron a una  $\lambda$  de excitación de 493 nm y una  $\lambda$  de emisión de 515 nm, las áreas bajo la curva de las gráficas de intensidad de fluorescencia con respecto al tiempo fueron calculadas mediante el KC4™ Data reduction Software (BioTek instruments, EEUU). Los resultados de capacidad antioxidante fueron expresados en unidades ORAC (1 unidad ORAC equivale a  $1\mu\text{mol TE}/100\text{g}$ ) (Davalos, et al., 2004).

#### **6.4.4 Ensayo ABTS<sup>•+</sup>**

Para la generación del catión radical del ABTS se basó en el desarrollo descrito por Re *et al.* (1999) y por Kuskoski *et al.* (2005). El ensayo mide la capacidad de las sustancias evaluadas para inhibir el catión radical del ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS<sup>•+</sup>). Se utilizó Trolox como compuesto de referencia.

Una disolución acuosa de ABTS 7 mM se incubó en presencia de persulfato potásico 2.45 mM durante 16 horas, a 25°C y en la oscuridad. Antes de llevar a cabo el ensayo con los aceites esenciales, la disolución con el radical ABTS<sup>•+</sup> se diluyó con etanol hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0,700 ( $\pm 0,02$ ) a 754 nm. Posteriormente se tomaron 900  $\mu\text{l}$  de esta disolución y se le añadió un volumen de 100  $\mu\text{l}$  de aceite de orégano en concentraciones de 40, 80, 120 y 150 ppm. La absorbancia se midió transcurridos 7 minutos. El blanco se preparó con 100  $\mu\text{l}$  de etanol y 900  $\mu\text{l}$  de la solución del ABTS. Los resultados de este ensayo se expresaron como capacidad antioxidante equivalente al Trolox TEAC (mmol Trolox/100g de muestra).

#### **6.5.- Análisis de AEO por cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas. (GC-MS)**

Las muestras de aceite esencial de orégano fueron diluidas en hexano y el volumen inyectado fue de 1 $\mu\text{l}$ . Para la cuantificación de los fenoles timol y carvacrol se utilizaron estándares externos Sigma Aldrich Timol pureza  $\geq 99\%$  (5-metil-2-isopropilfenol) Sigma Aldrich, USA. Carvacrol pureza  $\geq 97\%$  (5-isopropil-2-metilfenol), se adquirieron de



Sigma Aldrich, USA. Se realizó una curva de calibración en el rango de 6.2-49.6 mg/L para timol con un coeficiente de correlación de  $r^2 = 0.9965$ , para carvacrol el utilizado fue un rango de 10.9 – 87.2 mg/L con un coeficiente de correlación de  $r^2 = 0.9977$ . El análisis para el aceite esencial de orégano se realizó con las siguientes condiciones: GC - MS (6890 / 5973N), Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.). Se utilizó una columna HP-5 MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm). Las condiciones del GC fueron las siguientes: temperatura de inyección 250 ° C; la temperatura del horno se controló a 45 ° C durante 1 min con una velocidad de calentamiento de 10 ° C / min a 200 ° C durante 2 min, y finalmente de 10 ° C / min a 300 ° C durante 5 min. Se usó gas helio como gas portador a un flujo constante de 1 ml / min, volumen de inyección de muestra fue de 1 μl. El MS se trabajó con impacto electrónico como fuente de iones EI, energía electrónica 70 eV, temperatura de cuadrupolos 150 ° C, temperatura de interfaz 230 ° C, m / z = 30–400 amu. La identificación de los compuestos se realizó comparando sus espectros de masas con los de la biblioteca Wiley 7 n.L, considerando una coincidencia de calidad > 85% ( Arango, *et al.*, 2012).

## **6.6.- Obtener con el aceite esencial de orégano (AEO) una emulsión estable utilizando goma arábica (GA) y quitosano (Q)**

### **6.6.1 Preparación de la emulsión**

Las emulsiones fueron formuladas con GA y Q marca Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO. para tener una fase dispersa en fracción volumétrica de  $\phi_v = 0.09$  y  $\phi_v = 0.05$  y una relación AEO a material emulsionante (goma arábica: quitosano) en fracción másica de  $\phi_m = 1:1.1$  hasta  $\phi_m = 1:2.2$ . Las emulsiones de AEO fueron elaboradas con el método de deposición electrostática capa por capa (DCC) que consiste en 2 etapas: 1er etapa) se disolvió la GA en solución de ácido acético al 1%, para obtener una emulsión simple o primaria, a esta solución se agregó gota a gota el aceite esencial de orégano, a una velocidad de homogenización de 7600 rpm durante 5 min después, 2da etapa) se re-dispersó la emulsión primaria en una solución de Q a las siguientes relaciones 1.2% Q y 0.6% Q, mediante agitación magnética por 5 minutos. Se realizaron 3 fórmulas de emulsiones de AEO como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Formulaciones de emulsiones de AEO con GA y Q

	AEO	GA	Q	$\phi$
E1	5%	5%	0.6%	$\phi_v= 0.05$ y $\phi_m= 1.1$
E2	5%	10%	1.2%	$\phi_v= 0.05$ y $\phi_m= 2.2$
E3	9%	9%	1.2%	$\phi_v= 0.09$ y $\phi_m= 1.2$

## 6.6.2 Estabilidad de emulsiones

### 6.6.2.1 Tamaño de partícula y tasa de coalescencia

Se midió la estabilidad física de la emulsión usando un Malvern Mastersizer 3000 (Malvern Instruments, Ltd, Worcestershire, UK) con una unidad de Hydro LV usando agua como medio dispersante, el software calculo el tamaño de partícula a través de la determinación de la tasa de coalescencia al medir el tamaño de partícula ( $d_{30}$ ) y la distribución de los glóbulos en cada emulsión. La tasa de coalescencia de los glóbulos de una emulsión generalmente sigue una cinética de primer orden y se obtuvo a través de la siguiente ecuación:

$$\frac{N_t}{N_o} = \left[ \frac{(d_{30})_{t=0}}{(d_{30})_{t=t}} \right]^3 \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde  $N_t$  es el número de glóbulos al tiempo  $t$ ,  $N_o$  es el número de glóbulos al tiempo cero y  $Kc$  ( $s^{-1}$ ) es la tasa de coalescencia y está relacionada con la probabilidad de que se rompa la película interfacial al tiempo  $t$ . Al graficar  $\ln\left(\frac{N_t}{N_o}\right)$  versus  $t$  (s) (el tiempo de almacenamiento) para cada emulsión, de la pendiente se obtiene la tasa de coalescencia (Pérez, *et al.*, 2011).

### 6.6.2.2 Índice de cremado

10 g de emulsión fueron colocados en un tubo de ensaye (15mm de diámetro interno y 125mm de altura), las muestras fueron almacenadas a temperatura ambiente hasta el

término del experimento. Se midió la altura de la capa opaca (capa superficial,  $H_1$ ) y la capa semitransparente o menos opaca ( $H_2$ ), la altura total de la emulsión es ( $H_3 = H_1 + H_2$ ). El índice de cremado =  $100 \times (H_1/H_3)$  (Klinkesorn, 2009). Ecuacion 5

### **6.6.2.3 Medición del potencial- $\zeta$ :**

Se utilizaron soluciones acuosas de biopolímeros y emulsiones a una dilución de la concentración 1:200, aproximadamente 0.1 g de muestra se diluyeron a un volumen final de 20 mL usando agua destilada acidificada a pH 3.0 posteriormente la muestra fue inyectada a la cámara de medición del instrumento de movilidad electroforética Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, England, UK). Para las mediciones se uso una celda de inmersión universal (ZEN 1002, Malvern Instrument, Worcestershire, UK) a 25 °C. El potencial- $\zeta$  se determinó midiendo la dirección y velocidad de las gotas en un campo eléctrico aplicado, el software del equipo convierte las mediciones de movilidad electroforética en valores de potencial zeta utilizando el modelo Smoluchowski. La potencial zeta se calculó a partir del promedio de tres mediciones de las soluciones diluidas.

### **6.6.2.4 Estabilidad de la AA de emulsiones de AEO**

Para determinar la estabilidad en la actividad antioxidante de las emulsiones de AEO se utilizó el ensayo DPPH siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.4.2. en una cinética de 90 días usando como control AEO no emulsionado.

## **6.7.- Evaluar la capacidad antioxidante del aceite esencial de orégano en emulsiones estables de aceite de linaza (EAL) utilizando goma arábica (GA), goma de mezquite (GM) y quitosano (Q)**

### **6.7.1 Obtención de GA, GM, Q y AL**

La goma de mezquite (GM) exudado del árbol de mezquite (*Prosopis leavigata*) se obtuvo del estado de San Luis Potosí, México. La goma fue purificada en el laboratorio con la

técnica mostrada en el artículo de Vernon-Carter y col. (1996). La goma de arábica (GA) y el quitosano (Q) se obtuvo de Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO. El AL extra virgen prensado en frío marca Olimu procedente de Cuernavaca, Morelos, México. (66% alfa linolénico, 14% linoléico y 20% oleico)

### **6.7.2 Preparación de EAL**

Con la finalidad de aplicar a una matriz el AEO como aditivo antioxidante se utilizó un sistema emulsionado de AL con ácidos grasos insaturados que se oxidan fácilmente, se realizaron 3 diseños de EAL y se evaluó la capacidad antioxidante del AEO para proteger de la oxidación al AL.

#### **6.7.2.1 Diseño 1 de emulsiones de aceite de linaza (EAL) con GA y Q**

En el diseño 1 las emulsiones fueron elaboradas con el método de deposición electrostática capa por capa (DCC) en 2 etapas: 1er etapa) se disolvió la GA en solución de ácido acético al 1%, para obtener una emulsión simple o primaria, a esta solución se agregó gota a gota a el AL, a una velocidad de homogenización de 7600 rpm durante 5 min después, 2da etapa) se re-dispersaron la emulsión primaria en una solución de Q a 0.6% mediante agitación magnética por 5 minutos. Las EAL fueron formuladas como se observa en la Tabla 4 para tener una fase dispersa,  $\phi = 0.05$  y una relación de material emulsionante a aceite de linaza de 1:1. Se usaron diferentes concentraciones de AEO como aditivo antioxidante, como referencia se usó el antioxidante sintético butil hidroxitolueno (BHT) a 3 dosis. Como control se utilizó una emulsión sin antioxidantes (0ppm). También se evaluó el AL no emulsionado en 3 formas: sin antioxidantes, con BHT y con AEO. A las EAL y al AL no emulsionado se midieron hidropéroxidos y Tbars en cinética de 40 días. Tamaño de partícula y tasa de coalescencia, índice de cremado y potencial- $\zeta$  s en emulsiones de AL.

Tabla 4. Formulaciones de AL y EAL para medir la capacidad antioxidante del AEO

	AEO	BHT	AL	GA	Q
AL					
AL1	--	--	5%	5%	0.6%
AL2	--	30 ppm	5%	5%	0.6%
AL3	1200 ppm	--	5%	5%	0.6%
EAL método DCC					
EAL1	--	30 ppm	5%	5%	0.6%
EAL2	--	65 ppm	5%	5%	0.6%
EAL3	--	200 ppm	5%	5%	0.6%
EAL4	1200 ppm	--	5%	5%	0.6%
EAL5	2400 ppm	--	5%	5%	0.6%
EAL6	7400 ppm	--	5%	5%	0.6%
EAL7	--	--	5%	5%	0.6%

Las dosis de BHT a 30 ppm y AEO a 1200 ppm utilizadas fueron definidas por resultados previos obtenidos en los ensayos de DPPH para el AEO y BHT donde se obtuvieron porcentajes (%) de inhibición cercanos a la IC<sub>50</sub> del radical DPPH, las dosis de BHT a 65 ppm y AEO a 2400ppm son las que están cercanas al 100% de inhibición, también se utilizó la dosis recomendada comercialmente de BHT a 200ppm y de acuerdo a la relación de porcentaje de inhibición 1:37 aproximadamente que presentaron el BHT y el AEO en el ensayo DPPH se calculó su posible equivalencia en AEO de 7400 ppm.

#### 6.7.2.1.1 Ensayo de Hidroperóxidos

Para evaluar la capacidad antioxidante del AEO para proteger de la oxidación al AL emulsionado se midió la oxidación a través del tiempo por el índice de hidroperóxidos como medida de determinación de productos primarios de la oxidación durante 40 días. A 0.5 ml de emulsión se adicionaron 1.5 ml de una mezcla de isooctano/2-propanol (3:1, v/v), se agitaron 3 veces por 10 s y se centrifugaron por 15 min a 6000 rpm. La fase orgánica (0.2 ml) se mezcló con 2 ml de una solución metanol/1-butanol (2:1, v/v),

posteriormente se adicionaron 15  $\mu$ l de tiocianato de amonio 3.94 M y 15  $\mu$ l de una solución de iones hierro (obtenida de la mezcla de 0.132 M BaCl y 0.144 M Fe SO<sub>4</sub>), después de 20 minutos se midió la absorbancia a 510 nm con un espectrofotómetro UV/visible. La concentración de hidroperóxidos se calculó a partir de una curva estándar de hidroperóxidos de cumeno en un intervalo de concentraciones de 0-20 $\mu$ M, se tomaron 0.2ml de cada concentración y se siguió el mismo procedimiento que con las muestras, partiendo desde la adición de 2 ml de una solución metanol/1-butanol (2:1, v/v). Los resultados se expresaron en mmoles de hidroperóxido por kg de muestra (Adams, *et al.*, 2010).

#### **6.7.2.1.2 Ensayo de TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico)**

La formación de productos secundarios de la oxidación se realizó mediante la determinación de malonaldehído (MDA) y de TBARS, metodología descrita por Rodriguez *et al.* (2006). Este se basa en la reacción del MDA con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA). El MDA, en condiciones de bajo pH y alta temperatura, reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) dando lugar a un aducto MDA-TBA cromógeno o pigmento rojo que es detectable por espectrofotometría. Se tomaron 0.3 ml de cada emulsión de AL y se añadieron 2.7 ml de una mezcla de etanol con BHT al 0.06%, se agitaron en vortex por 10 s, se centrifugaron a 3000 rpm por 10 min, posteriormente se tomaron 50 $\mu$ l del sobrenadante y se colocó en un tubo de ensayo y se añadieron 1.95 ml de reactivo de TBA se mezclaron en vortex por 10 s, se sometieron a calentamiento a 100 °C por 15 min, después de enfriar se midió la absorbancia a 532 nm con un espectrofotómetro UV/visible. Se elaboró una curva de calibración con 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) en un intervalo de concentraciones de 0-4 $\mu$ M, como se muestra en la Tabla 5 a partir de una disolución con una concentración de 80  $\mu$ M. Las soluciones preparadas fueron 0,0, 0,4, 0,8, 1,6, 2,5, y 4,0  $\mu$ M, con los que se realizó la calibración.

Tabla 5. Preparación de soluciones para curva de calibración de determinación de TBARS

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Solución 80 $\mu\text{mol}$ ( $\mu\text{l}$ )	Agua destilada (ml)
0.0	0	10.0
0.4	50	9.95
0.8	100	9.90
1.6	200	9.80
2.5	310	9.69
4.0	500	9.50

De cada concentración se tomaron 50 $\mu\text{l}$ , el mismo procedimiento se siguió que con las muestras, partiendo desde la adición de 1.95ml de reactivo TBA. Los resultados se expresaron en mM de malonaldehído por kg de muestra.

### **6.7.2.1.3 Estabilidad de las emulsiones**

#### **6.7.2.1.3.1 Tamaño de partícula y tasa de coalescencia**

Para la medición de la estabilidad física en cada emulsión se determinó el tamaño de partícula y tasa de coalescencia siguiendo la metodología detallada en el apartado 6.6.2.1

#### **6.7.2.1.3.2 Índice de cremado**

Se midió el índice de cremado en las emulsiones de AL siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.6.2.2

#### **6.7.2.1.3.3 Medición del potencial- $\zeta$ :**

Para la medición del potencial- $\zeta$  de las emulsiones se utilizó la metodología detallada en el apartado 6.6.2.3

### 6.7.2.2 Diseño 2 EAL con GM y Q

En el diseño 2 partiendo de los resultados obtenidos del diseño 1, se modificaron las dosis evaluadas de AEO y BHT y se utilizó GM, las EAL fueron elaboradas por dos métodos, por el método tradicional (MT) obteniendo emulsiones simples y por el método de deposición electrostática capa por capa (DCC), con el MT para obtener una emulsión simple se disolvió la GM en solución de ácido acético al 1%, y a esta solución se agregó gota a gota el AL, a una velocidad de homogenización de 7600 rpm durante 5 min con una fase dispersa  $\phi = 0.10$  y una relación de material emulsionante a AL de 1:1. Las emulsiones elaboradas con el método DCC fueron en 2 etapas (1er etapa) con una  $\phi = 0.05$  y una relación de material emulsionante a AL de 1:1, se disolvió la GA en solución de ácido acético al 1%, para obtener una emulsión simple o primaria, a esta solución se agregó gota a gota el AL, a una velocidad de homogenización de 7600 rpm durante 5 min después, (2da etapa) se re-dispersaron la emulsión primaria en una solución de Q a 2% mediante agitación magnética por 5 minutos. La concentración de AEO como aditivo antioxidante utilizada fue a diferentes dosis y como referencia se usó el antioxidante sintético BHT. Se prepararon 8 emulsiones según Tabla 6.

Tabla 6. Formulaciones de EAL con GM y Q por MT y método DCC para medir la capacidad antioxidante del AEO

	AEO	BHT	AL	GM	Q
	MT				
E1	--	--	10%	10%	--
E2	1200 ppm	--	10%	10%	--
E3	--	30 ppm	10%	10%	--
	DCC				
E4	300 ppm	--	5%	5%	2%
E5	600 ppm	--	5%	5%	2%
E6	1200 ppm	--	5%	5%	2%
E7	2400 ppm	--	5%	5%	2%
E8	--	30 ppm	5%	5%	2%



En cada emulsión se midieron hidroperóxidos y Tbars en una cinética de 40 días, así como tamaño de partícula, índice de cremado y potencial- $\zeta$ .

#### **6.7.2.2.1 Hidroperóxidos**

Para evaluar la capacidad antioxidante del AEO para proteger de la oxidación al AL emulsionado se midió la oxidación a través del tiempo por el índice de hidroperóxidos siguiendo la metodología como se indica en el apartado 6.7.2.1.1

#### **6.7.2.2.2 Ensayo de TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico)**

La determinación de malonaldehído (MDA) y de TBARS, se realizó con la metodología descrita en el apartado 6.7.2.1.2

#### **6.7.2.2.3 Estabilidad de las emulsiones**

##### **6.7.2.2.3.1 Tamaño de partícula y tasa de coalescencia**

Para la medición de la estabilidad física en cada emulsión se determinó el tamaño de partícula y tasa de coalescencia siguiendo la metodología detallada en el apartado 6.6.2.1

##### **6.7.2.2.3.2 Índice de cremado**

Se midió el índice de cremado en EAL siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.6.2.2

##### **6.7.2.2.3.3 Medición del potencial- $\zeta$ :**

Para la medición del potencial- $\zeta$  de las emulsiones se utilizó la metodología detallada en el apartado 6.6.2.3

### 6.7.2.3 Diseño 3 de EAL con GA y Q

En el diseño 3, con la finalidad de utilizar la GA se utilizaron las mismas dosis de AEO y BHT que en el diseño 2, las EAL fueron elaboradas por 2 métodos, por el método tradicional (MT) obteniendo emulsiones simples y por el método de deposición electrostática capa por capa (DCC), con el MT para obtener una emulsión simple se disolvió la GM en solución de ácido acético al 1%, y a esta solución se agregó gota a gota el AL, a una velocidad de homogenización de 7600 rpm durante 5 min con una fase dispersa  $\phi = 0.05$  y una relación de material emulsionante a AL de 1:1. Las emulsiones elaboradas con el método DCC fueron en 2 etapas (1er etapa) con una  $\phi = 0.025$  y una relación de material emulsionante a AL de 1:1, se disolvió la GA en solución de ácido acético al 1%, para obtener una emulsión simple o primaria, a esta solución se agregó gota a gota el AL, a una velocidad de homogenización de 7600 rpm durante 5 min después, (2da etapa) se re-dispersaron la emulsión primaria en una solución de Q a 2% mediante agitación magnética por 5 minutos. La concentración de AEO como aditivo antioxidante utilizada fue a diferentes dosis y como referencia se usó el antioxidante sintético BHT. Se prepararon 8 emulsiones según Tabla 7.

Tabla 7. Formulaciones de EAL con GA y Q por MT y método DCC para medir la capacidad antioxidante del AEO

	AEO	BHT	AL	GA	Q
MT					
E1	--	--	5%	5%	--
E2	1200 ppm	--	5%	5%	--
E3	--	30 ppm	5%	5%	--
DCC					
E4	300 ppm	--	2.5%	2.5%	2%
E5	600 ppm	--	2.5%	2.5%	2%
E6	1200 ppm	--	2.5%	2.5%	2%
E7	2400 ppm	--	2.5%	2.5%	2%
E8	--	30 ppm	2.5%	2.5%	2%

En cada emulsión se midió hidroperóxidos y Tbars en una cinética de 40 días, así como tamaño de partícula, índice de cremado y potencial- $\zeta$ .

#### **6.7.2.3.1 Hidroperóxidos**

Para evaluar la capacidad antioxidante del AEO para proteger de la oxidación al AL emulsionado se midió la oxidación a través del tiempo por el índice de hidroperóxidos siguiendo la metodología como se indica en el apartado 6.7.2.1.1

#### **6.7.2.3.2 Ensayo de TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico)**

La determinación de malonaldehído (MDA) y de TBARS, se realizó con la metodología descrita en el apartado 6.7.2.1.2

#### **6.7.2.3.3 Estabilidad de las emulsiones**

##### **6.7.2.3.3.1 Tamaño de partícula y tasa de coalescencia**

Para la medición de la estabilidad física en cada emulsión se determinó el tamaño de partícula y tasa de coalescencia siguiendo la metodología detallada en el apartado 6.6.2.1

##### **6.7.2.3.3.2 Índice de cremado**

Se midió el índice de cremado en las EAL siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.6.2.2

##### **6.7.2.3.3.3 Medición del potencial- $\zeta$ :**

Para la medición del potencial- $\zeta$  de las emulsiones se utilizó la metodología detallada en el apartado 6.6.2.3

## **6.8. Obtención de microcápsulas de aceite esencial de orégano (AEO) mediante secado por aspersión (Spray dry) utilizando goma arábiga (GA), quitosano (Q) y maltodextrina (MD)**

### **6.8.1 Preparación de emulsiones de AEO para secado**

Las emulsiones de AEO para secado fueron formuladas con GA y Q que se obtuvieron de Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO. para tener una fase dispersa en fracción volumétrica de  $\phi = 0.025$  con diferentes relaciones de AEO y material emulsionante. Las emulsiones de AEO fueron elaboradas con MT para obtener emulsiones simples y por el método DCC que consiste en 2 etapas, previamente descritos. Se utilizó MD marca Amidex 10 elaborado por Ingredion México S.A. de C.V. Se realizaron 4 fórmulas de emulsiones para secado como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Formulaciones de secado de AEO con GA y Q para obtener microcápsulas mediante el proceso de secado por aspersión (Spray dry)

	AEO	GA	Q	MD
E1	2.5%	2.5%	2%	10%
E2	2.5%	2.5%	--	10%
E3	2.5%	5%	--	10%
E4	2.5%	7.5	--	10%

### **6.8.2 Formación de microcápsulas:**

Las emulsiones de aceite esencial de orégano se alimentaron a un secador por aspersión, a una temperatura de entrada de  $160^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  y a una temperatura de salida de  $80^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ , con una presión de atomización de 3.5 bar.

### **6.8.3 Características de las microcápsulas obtenidas, color, Aw y Humedad**

#### **6.8.3.1 Color**

Las mediciones de color de las microcápsulas se realizaron por colorimetría de reflectancia de triestímulos. Se utilizó un Color Flex EZ (Hunter Lab, Reston, VA, EE.

UU.). Se colocó una cantidad 3g de muestra y los análisis se realizaron por triplicado para determinar los parámetros X, Y y Z .

### **6.8.3.2 Actividad de agua (Aw)**

La actividad de agua (Aw) fue medida por lectura directa en un equipo digital AQUALAB, modelo 4TE (Decagon Devices Inc., Pullman, WA) con temperatura controlada de 25 °C.

### **6.8.3.3 Humedad**

La humedad se determinó mediante el método de la AOAC (1990) de secado en estufa. Se pesaron 3 g de microcápsulas recién obtenidas y se secaron en una estufa a 70 °C por 24 horas.

### **6.8.4 Retención total de AEO y eficiencia de microencapsulación**

El cálculo de retención total de AEO se realizó determinando la cantidad de aceite presente en un peso conocido de microcápsulas y se procedió a calcular la retención total de AEO (RT) de microencapsulación, el cual es la razón del aceite a encapsular con respecto al adicionado en la emulsión, según lo definido por Ramos 2009 y Da Costa *et al.*, 2013. Utilizando la ecuación 6 se obtuvo el cálculo correspondiente.

$$RT = \frac{\text{Aceite}_{\text{total}}}{\text{Aceite}_{\text{inicial}}} \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde  $\text{Aceite}_{\text{total}}$  es la concentración de aceite después del proceso de secado y  $\text{Aceite}_{\text{inicial}}$  es la concentración de aceite antes del secado.

El cálculo de la eficiencia de microencapsulación (ME) nos indica el porcentaje de aceite esencial encapsulado que no está expuesto a condiciones ambientales. Utilizando la ecuación 7 se calculó la eficiencia de la microencapsulación:

$$ME = \frac{(\text{Aceite}_{\text{total}} - \text{Aceite}_{\text{superficial}})}{\text{Aceite}_{\text{total}}} \times 100$$

Ecuación 7

Donde ME es la eficiencia de encapsulación,  $\text{Aceite}_{\text{total}}$  es el total de la cantidad de aceite y  $\text{Aceite}_{\text{superficial}}$  es la cantidad de aceite no encapsulado presente en la superficie de la microcápsula.

### **6.8.5 Análisis de AEO de microcápsulas por cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas. (GC-MS)**

Las muestras de aceite esencial de orégano fueron diluidas en hexano y el volumen inyectado fue de 1 $\mu$ l siguiendo la metodología del apartado 6.5.

### **6.8.6 Actividad antioxidante de microcápsulas**

#### **6.8.6.1 Actividad antioxidante**

Para determinar su estabilidad en la actividad antioxidante, a 0.1g de microcápsulas se adicionaron 10ml de etanol y se disolvieron en vortex durante 10 s, posteriormente se centrifugaron a 3000rpm por 10 min, para el ensayo DPPH se determinó el % de Inhibición al radical DPPH en la dosis de 1200 ppm en los 4 secados de microcápsulas con la metodología descrita en el apartado 6.4.2.

#### **6.8.7 Medición del potencial- $\zeta$ :**

Para la medición del potencial- $\zeta$  de las emulsiones para secado y microcápsulas se utilizó la metodología detallada en el apartado 6.6.2.3

### **6.8.8 Microscopia Electrónica de Barrido en microcápsulas**

La morfología de las microcápsulas se determinó mediante la toma de micrografías, se utilizó microscopio electrónico de barrido (MEB) JEOL JMS 7600F obtenida con la metodología reportada por Valverde, 2016. Se colocó la muestra en trozos de aluminio en

el MEB y recubiertos con oro/paladio. El microscopio utilizado fue un JSM-6490LV (JEOL, Tokio, Japón).

### **7.0 Diseño experimental y análisis Estadístico**

Los resultados obtenidos en la parte experimental de este estudio se sometieron a un análisis ANOVA y comparación de medias Tukey, para esto se utilizó el programa estadístico SPSS Statistics versión 17.

## 8.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 Muestreo y obtención de material biológico.

Se adquirió el orégano cultivado (*Poliomintha longiflora* Gray) en el municipio de Higueras, N. L. (Figura 10). Las coordenadas del sitio son latitud: 25°58'20.88"N, longitud: 100°0'54.00"O



Figura 10. Localización del municipio de Higueras en el mapa de Nuevo León.

En el invierno (enero), verano (junio) y otoño (septiembre) de los años 2011 y 2012 se trabajó con orégano cultivado secado a sol como se muestra en la Figura 11.



Figura 11. Cultivo de *Poliomintha longiflora* Gray en el municipio de Higueras.



Las muestras obtenidas de las plantas de orégano como objeto de estudio fueron de 2 composiciones: una muestra simple 100% hoja (hoja) y una muestra compuesta que es la forma como se vende comercialmente de hoja:cáliz relación 82:18 % llamada mixto (mixto) mostrado en la Figura 12.



Figura 12. Hojas y cáliz de orégano cultivado *Poliomintha longiflora* Gray en el municipio de Higueras.

## 8.2 Extracción del aceite esencial de orégano (AEO)

A nivel laboratorio para obtener el aceite esencial de orégano por el método de arrastre de vapor, primero se adaptó un destilador con materiales de vidrio de uso común posteriormente se realizaron modificaciones a un equipo de tipo autoclave como se muestra del lado derecho de la Figura 13 al cual se le colocó un refrigerante fabricado en acero inoxidable con la finalidad de utilizar mayores cantidades de muestra para la obtención de AEO.



Figura 13. Destilador de arrastre de vapor adaptado con una autoclave a nivel laboratorio, para obtener mayores rendimientos de aceite esencial de orégano.

### 8.3 Caracterización fisicoquímica del aceite esencial de orégano obtenido

El rendimiento de aceite esencial obtenido en invierno (enero 2012), verano (junio 2012) y otoño (septiembre 2011) en las muestras de composición mixto y hojas fue de 1.5% a 3.5% como se muestra en la Figura 14. En la temporada de invierno y verano, no hay diferencia en la obtención de AEO tanto de hojas como mixto que fue de 1.6 a 1.9% son temporadas donde se registra una menor precipitación durante el año y no así en el otoño que se caracteriza por la presencia de lluvias y pudiera contribuir a un mayor rendimiento de aceite esencial de orégano.

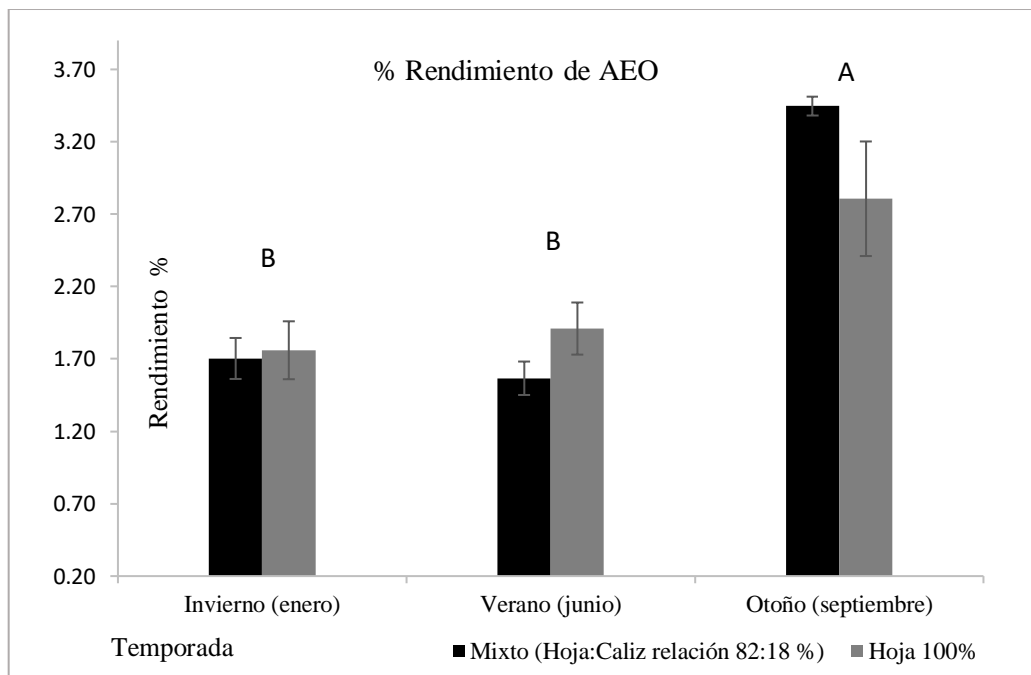


Figura 14. Rendimiento (%) de AEO obtenido por arrastre de vapor en hoja y mixto en tres temporadas. Letras mayúsculas iguales sobre las barras representan que no hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las temporadas.

La diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en el rendimiento de aceite de orégano está dada por la temporada obteniendo mayor rendimiento de aceite cuando es otoño (septiembre) y no habiendo diferencia por la composición cuando la muestra es mixto o son hojas. El incremento en el rendimiento de aceite esencial de orégano se pudo deber a la presencia

de lluvias durante la temporada de otoño, otros autores han reportado un incremento en la producción de aceite esencial en temporada de lluvias (Demuner *et al.*, 2011). El mayor rendimiento de aceite esencial que se obtuvo en la temporada de otoño coincide con lo reportado para la especie de orégano *Poliomintha* donde el mayor rendimiento de aceite esencial de orégano cultivado en el municipio de higueras se obtuvo también durante la temporada de otoño del 2013 (Rodríguez, 2014).

Pero también algunos autores mencionan que la principal variabilidad en rendimiento de aceite es debido principalmente al origen según Moriconu, 2009. Por otro lado la literatura reporta valores de 1% hasta 5.6 % de aceite para las especies conocidas como orégano (Muñoz, 2007; Paredes 2007 y Arcila, 2004).

Las características fisicoquímicas de índice de refracción y densidad de los AEO (Tabla 9) muestran valores en un rango de 1.4616- 1.4624 en el índice de refracción y valores de 0.9207-0.9277 para densidad.

Tabla 9. Características fisicoquímicas de los AEO, índice de refracción (I.R.) y densidad

Temporada	características Fisicoquímicas			
	I.R.		Densidad	
	Hojas	Mixto	Hojas	Mixto
Invierno	1.4618±0.0000	1.4622±0.0000	0.9277±0.0012	0.9207±0.0012
Verano	1.4619±0.0000	1.4623±0.0000	0.9207±0.0012	0.9213±0.0012
Otoño	1.4616±0.0001	1.4624±0.0000	0.9233±0.0012	0.9257±0.0012

## 8.4 Determinación de la concentración de polifenoles y capacidad antioxidante del AEO (DPPH, ABTS y ORAC)

### 8.4.1 Ensayo Folin-ciocalteu

Este método indirecto mide actividad reductora (rx redox) y es adecuado como procedimiento preliminar de detección de potencial antioxidante, no diferencia

antioxidantes de agentes reductores por lo que cualquier agente reductor tendrá buenos resultados en el ensayo (Amorati, *et al.*, 2013).

Los resultados logrados en la prueba de contenido de polifenoles totales como GAE (mg equivalentes de ácido gálico por gramo) de aceite de orégano muestran un mayor contenido en las tres temporadas cuando la composición de la muestra es hojas con valores en los rangos de 147 GAE mg/g hasta 171 GAE mg/g como se muestra en la Figura 15.

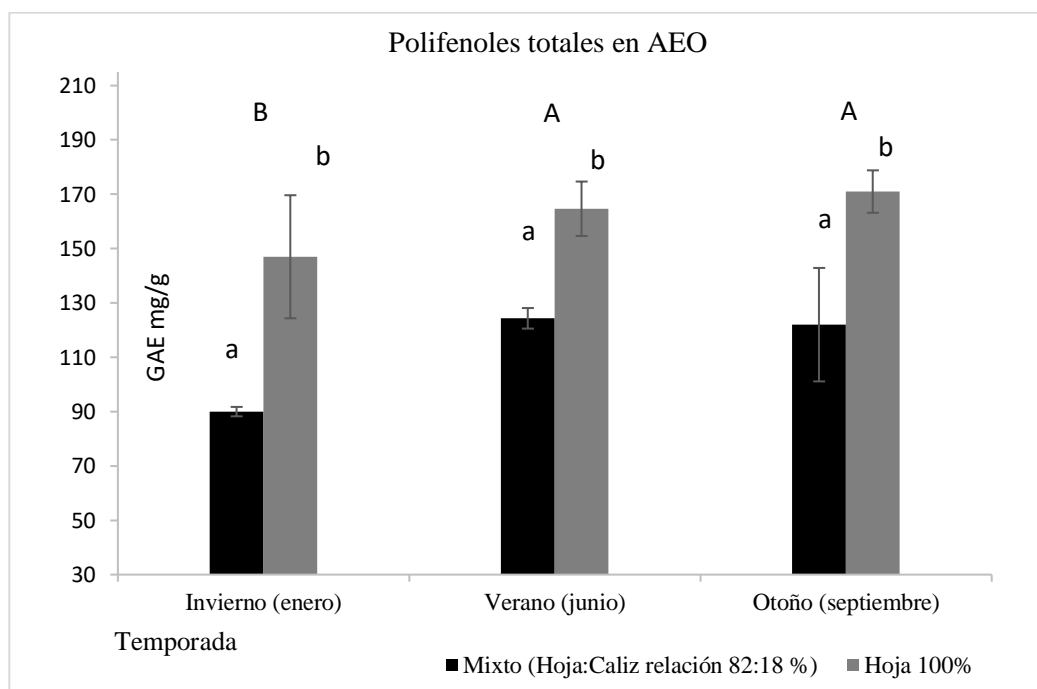


Figura 15. Polifenoles totales en equivalentes de ácido gálico (GAE mg/g) en AEO de hojas y mixto de tres temporadas. Letras mayúsculas iguales sobre las barras representan que no hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las temporadas y letras minúsculas diferentes representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) dentro de las temporadas en mixto y hojas.

La diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en el contenido de polifenoles totales en el aceite de orégano es afectada por la composición de la muestra si es mixto o si son hojas, obteniendo el mayor contenido de polifenoles totales cuando la muestra son hojas y en las temporadas de verano y otoño. En aceites esenciales de varios oréganos mexicanos se reportan valores de 13.2 hasta 87.9 GAE mg/g, siendo los resultados obtenidos mayores a los reportados (Silva, *et al.*, 2017).

### 8.4.2 Ensayo DPPH

Se determinó para todas las muestras de AEO en concentración fija de 1200 ppm por el método DPPH la capacidad antioxidante como porcentaje de inhibición del radical DPPH por ser la concentración en los AEO estudiados cercana a porcentajes de inhibición del 50% en pruebas preliminares. Los valores obtenidos como porcentaje de inhibición se encuentran en un rango de 51.6% hasta 60.8% a mayor porcentaje de inhibición del radical DPPH mayor es la capacidad antioxidante del AEO como se aprecia en la Figura 16.

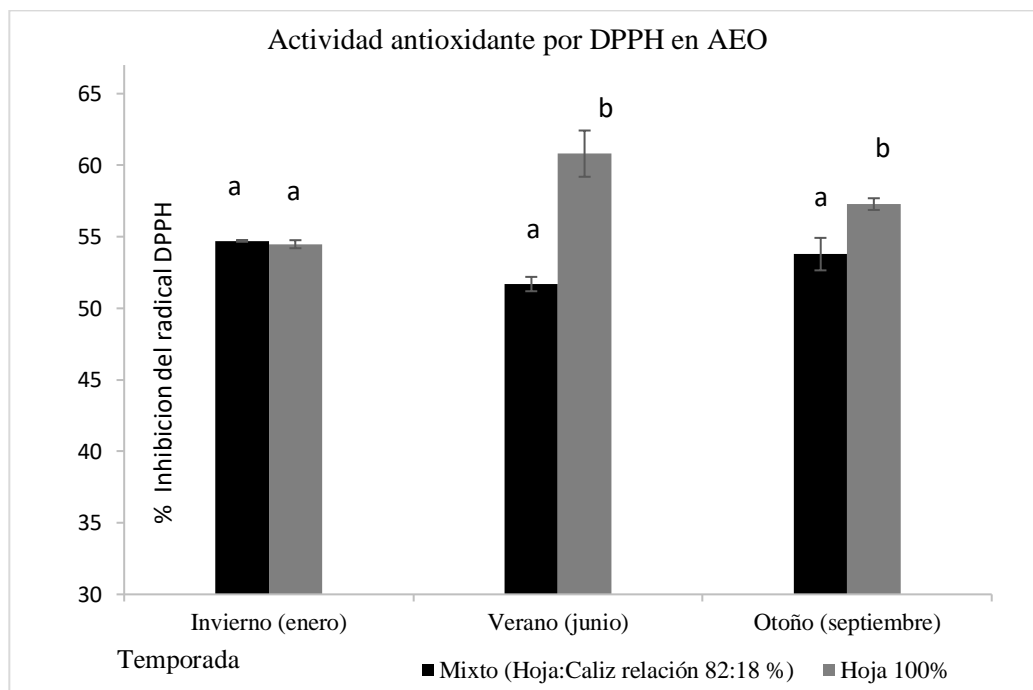


Figura 16. Actividad antioxidante por DPPH en porcentaje de inhibición del radical DPPH de los AEO de las muestras de hoja y mixto de tres temporadas. Letras minúsculas diferentes representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) dentro de las temporadas en mixto y hojas.

La diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la capacidad antioxidante en el aceite de orégano para inhibir el radical DPPH está dada por la composición de la muestra cuando son hojas y mixto y no es afectada por la temporada ( $p < 0.05$ ). En el invierno a diferencia del resto de las temporadas la composición de la muestra no tiene influencia en la capacidad

antioxidante. La mejor capacidad antioxidante para inhibir el radical DPPH se obtuvo en el AEO de hojas. La literatura reporta concentraciones en un rango de 680 ppm -1820ppm para porcentajes de inhibición del 50% (Olivas, *et al.*, 2020)

### 8.4.3 Ensayo ABTS

Para el método ABTS los resultados obtenidos y expresados como TEAC (micromoles de actividad antioxidante equivalente de Trolox) por cada 100g de aceite de orégano comprenden valores de 100,000 hasta los 160,000 aproximadamente (Figura 17).

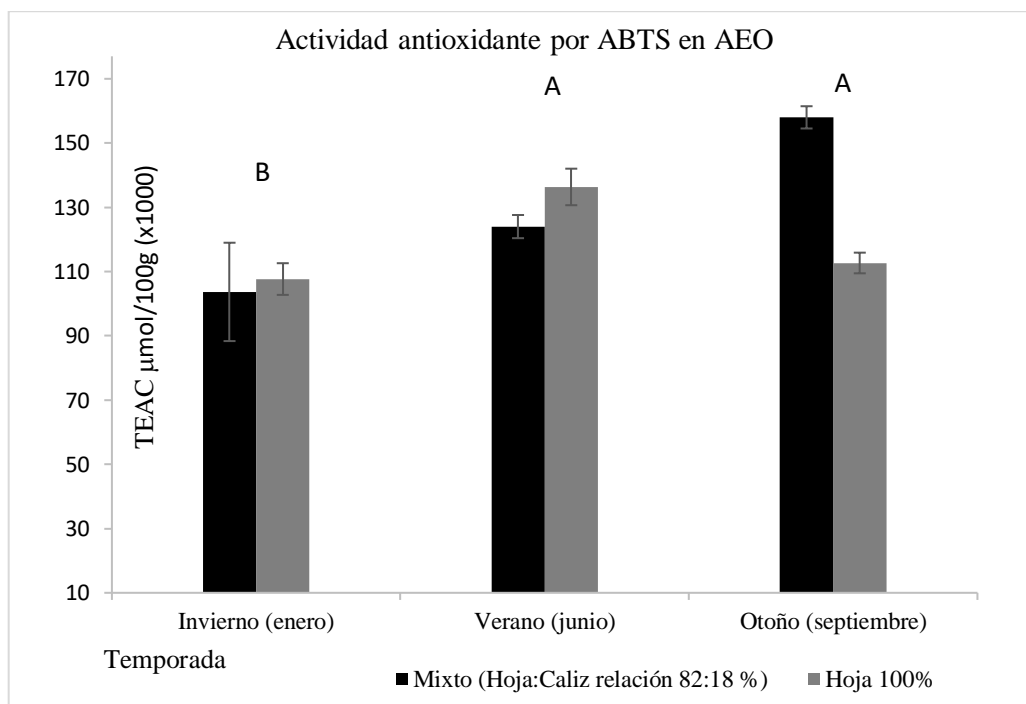


Figura 17. Actividad antioxidante por ABTS en micromoles equivalentes de Trolox (TEAC  $\mu\text{mol}/100\text{g}$ ) de los AEO de las muestras de hoja y mixto de tres temporadas. Letras mayúsculas iguales sobre las barras representan que no hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las temporadas.

La diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la actividad antioxidante por el método ABTS en el aceite de orégano está dada por la temporada de verano y otoño con mayor actividad antioxidante con respecto a la temporada de invierno y no así por la composición de la

muestra. Se han reportado en especies de orégano griego en pruebas de ABTS valores de 43,008 hasta 39,700 de TEAC  $\mu\text{mol}/100\text{g}$  por Kosakowska, *et al.*, 2021.

#### 8.4.4 Ensayo ORAC

En el método ORAC los resultados obtenidos como unidades ORAC (micromoles de actividad antioxidante equivalente de Trolox (TE) por cada 100g) de aceite de orégano comprenden valores de 120,000 hasta los 153,000 aproximadamente (Figura 18).

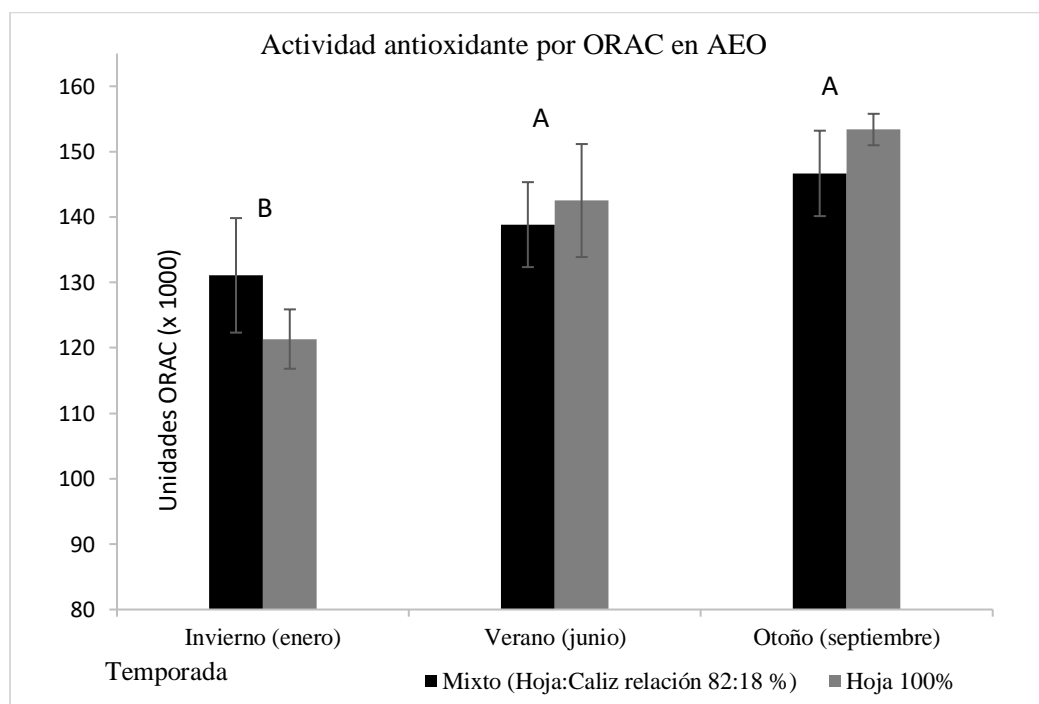


Figura 18. Actividad antioxidante en Unidades ORAC (TE  $\mu\text{moles}/100\text{g}$ ) de los AEO de las muestras de hoja y mixto de tres temporadas. Letras mayúsculas iguales sobre las barras representan que no hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las temporadas.

La diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la actividad antioxidante en el aceite de orégano es debida a la temporada de junio y septiembre siendo mayor actividad con respecto a enero y no así por la composición de la muestra. Estudios reportados en aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) usado en procesos de encapsulación reportan valores ORAC de  $208,000 \pm 2100 \mu\text{mol TEAC}/100\text{g}$  (Beirão *et al.*, 2012). Por otro lado los valores reportados en la base de datos de la USDA para orégano es de 159,277 valor de

ORAC (Haytowitz, 2010). Los valores obtenidos en este trabajo se encuentran en los rangos reportados en estudios previos.

### 8.5 Cuantificación de timol y carvacrol en el aceite esencial de orégano por cromatografía de gases (GC)

El contenido de timol (% p/p) en los aceites de orégano fue variable y comprenden valores de 10% a 16% aproximadamente (Figura 19).

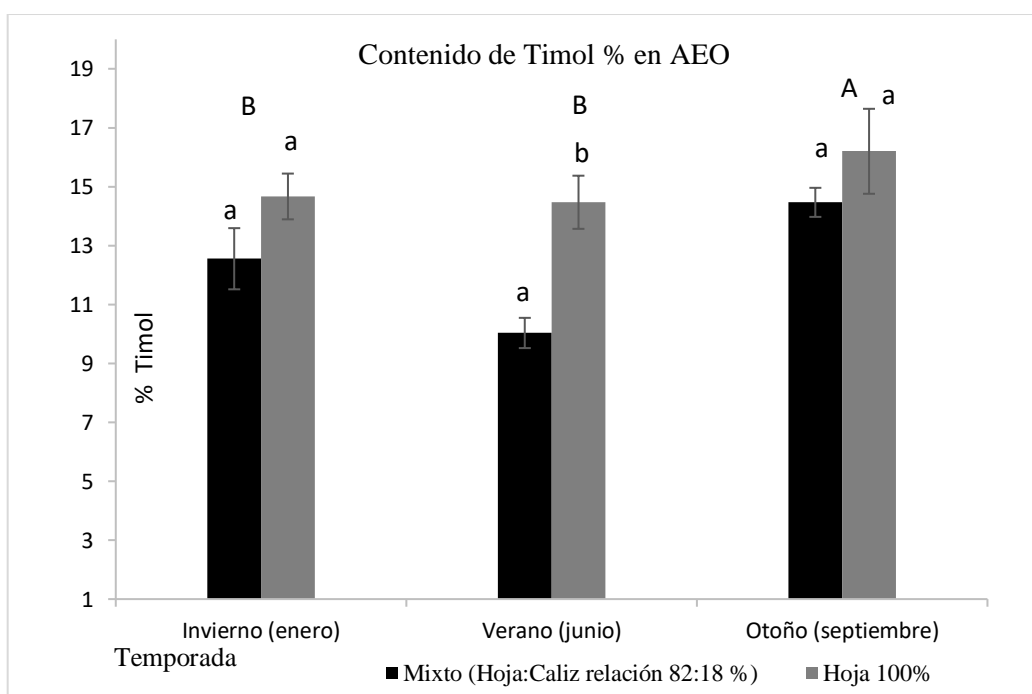


Figura 19. Contenido en porcentaje de timol en los AEO de las muestras de hoja y mixto de tres temporadas. Letras mayúsculas iguales sobre las barras representan que no hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las temporadas y letras minúsculas diferentes representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) dentro de las temporadas en mixto y hojas.

La diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en el contenido de timol en el aceite de orégano es debida a la temporada y a la composición anatómica de la muestra mixto y hoja. El mayor contenido de timol se presenta cuando la composición de la muestra son hojas en las tres temporadas. En la temporada de otoño (septiembre) se presentó el mayor contenido de timol ( $p < 0.05$ ) sin diferencia en muestras de composición de hojas o mixto. Por lo que el



aprovechamiento de la planta de orégano sería mayor en la temporada de otoño para la extracción de aceite.

El contenido de carvacrol (% p/p) en los aceites de orégano fue variable en las temporadas y en la composición de la muestra con valores entre 20% a 32% aproximadamente (Figura 20).

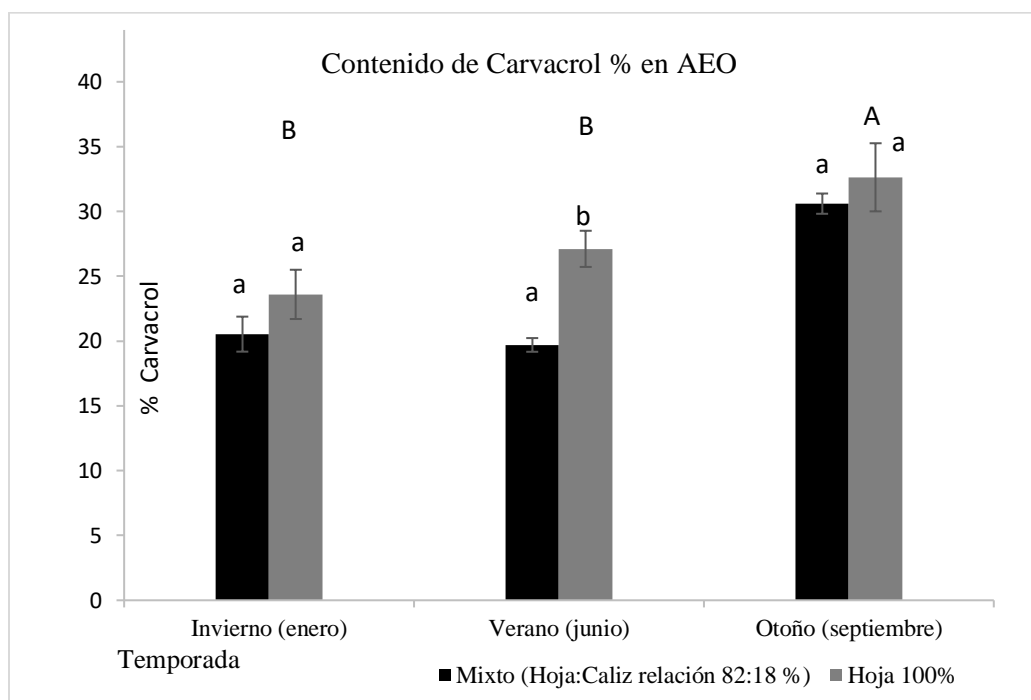


Figura 20. Contenido en porcentaje de carvacrol en los AEO de las muestras de hoja y mixto de tres temporadas. Letras mayúsculas iguales sobre las barras representan que no hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las temporadas y letras minúsculas diferentes representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) dentro de las temporadas en mixto y hojas.

La diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en el contenido de carvacrol en el aceite de orégano está dada por la diferente composición anatómica de la muestra mixto y hojas y así también por la temporada. Durante las temporadas el mayor contenido se obtuvo en hojas. El otoño fue la temporada con mayor contenido de carvacrol y sin diferencia ( $p < 0.05$ ) entre muestras de composición hojas y mixto, obteniendo un mayor aprovechamiento de la planta de orégano para la extracción de aceite en la temporada de otoño.

Altos contenidos de carvacrol son deseables cuando se busca una actividad biológica específica como sugiere Walczak *et al.* 2021, donde la habilidad del timol y carvacrol en biofilm de superficies de polipropileno, polietileno y acero inoxidable usadas en producción de alimentos y fármacos fue estudiada, mostrando el carvacrol ser mas efectivo reduciendo la cantidad de biofilm comparado con el timol.

La suma de los fenoles Timol y Carvacrol (% p/p) principales responsables de la actividad antioxidante en los aceites de orégano durante las temporadas y composición de muestra hojas y mixto fue superior al 30% y como máximo 49% aproximadamente (Figura 21).

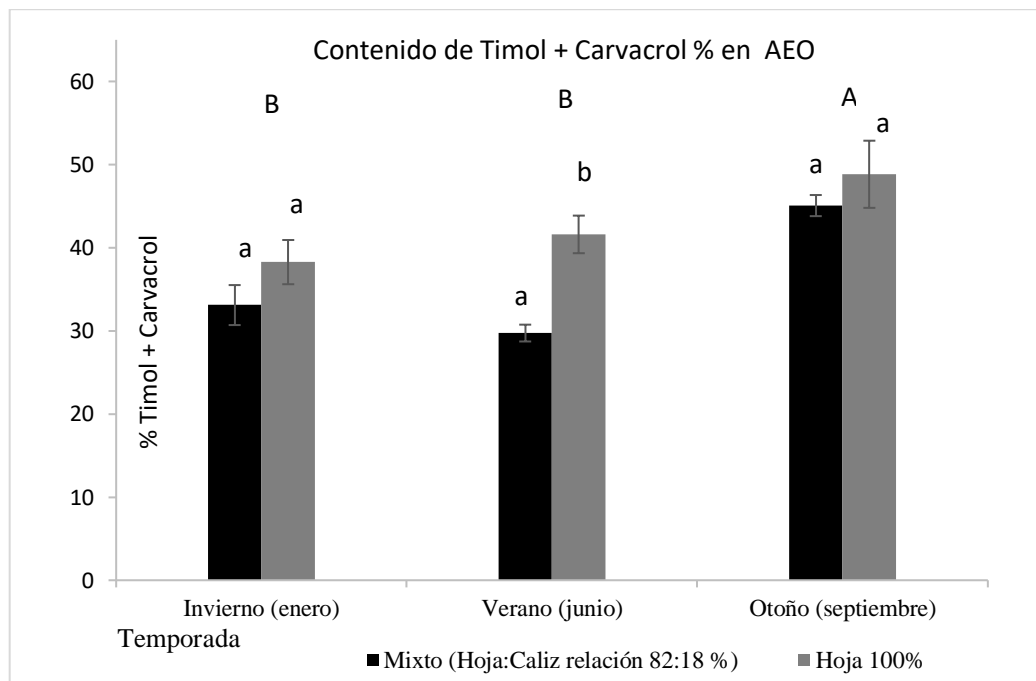


Figura 21. Contenido total en porcentaje de timol y carvacrol en AEO de las muestras de hoja y mixto de tres temporadas. Letras mayúsculas iguales sobre las barras representan que no hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las temporadas y letras minúsculas diferentes representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) dentro de las temporadas en mixto y hojas

La diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en el total de Timol + Carvacrol en el aceite de orégano está dada por la temporada de otoño que presentó el mayor contenido total de estos fenoles sin diferencia en la composición de muestra. La relación proporcional que se guarda entre timol y carvacrol en los aceites de orégano cultivado es de

aproximadamente de 1:1.5 hasta 1: 2, es decir por 1 parte de timol la presencia de carvacrol es cercana a 2 partes. Varios estudios reportan que antioxidantes presentes en el orégano se encuentran en diferente cantidad y distribución dependiendo de la parte en que se encuentren de la planta como las hojas, tallos y flores (Muñoz, *et al.*, 2007). En las hojas de *Lippia origanoides* se reporta carvacrol + timol 53.2%,  $\rho$ -cimeno 10.1%,  $\Upsilon$ -terpineno y trans- $\beta$ -cariofileno 3.4% (Muñoz, *et al.*, 2007), otro estudio reporta en 6 aceites esenciales de orégano (*origanum vulgare*) la presencia de timol (0.2-5.8%) y carvacrol (58.7-77.4%) (Carrasco, *et al* 2016).

### 8.6 Emulsiones de AEO con GA y Q

Los formulados obtenidos de emulsiones de aceite esencial de orégano (EAEO) fueron 3 (Figura 22) con cantidades variables de GA y Q y como control el AEO, se les determinó la actividad antioxidante (AA) como el % de inhibición al radical DPPH a concentración de 1200ppm y un tiempo de 2.5h



Figura 22. Formulados de AEO emulsionado con GA y Q

Los resultados de actividad antioxidante (AA) se expresaron como % de conservación de la AA a los 45 días (Figura 23) donde el control fue el AEO el cual no presento variación, por lo que se conservó el 100% de su AA. La emulsión E2AEO no mostro diferencia significativa respecto al control de AEO y conservo su AA, mientras que el resto de las emulsiones disminuyeron significativamente la AA, con valores de conservación de la AA de 70% y 87% en las emulsiones E1AEO y E3AEO respectivamente, en estas emulsiones la relación de material de pared respecto al AEO es de aproximadamente 1:1, mientras que para el formulado E2AEO fue de 2:1 material de pared respecto al AEO protegiendo

con mayor eficiencia el material encapsulado permitiendo conservar su AA sin cambios significativos.

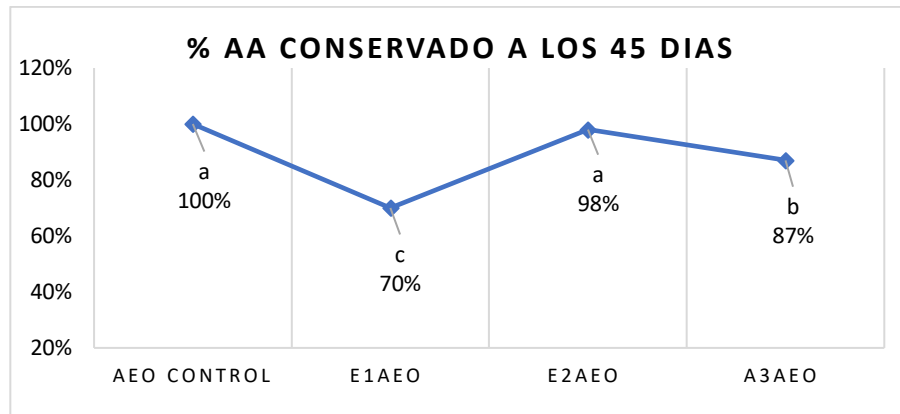


Figura 23. Porcentaje (%) de actividad antioxidante (AA) conservado a los 45 días en emulsiones de AEO con diferentes relaciones de material de pared y AEO. Letras minúsculas diferentes representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

La AA se evaluó a una misma concentración de 1200ppm por ser la dosis cercana a la  $IC_{50}$  (concentración inhibitoria media al radical DPPH) en resultados previos. Los resultados obtenidos como % de inhibición del radical DPPH durante una cinética de 45 días mostraron al AEO utilizado como control con un valor inicial de 54% el cual no tuvo variación, al igual que la E2AEO pero en las emulsiones E1AEO y E3AEO se aprecia una disminución en la capacidad de inhibir el radical DPPH en el día 15 con un valor de 42%, en ambas emulsiones y en la E1AEO la disminución en la capacidad de inhibir el radical DPPH continuo hasta un valor de 38% al término de la cinética. (Figura 24).

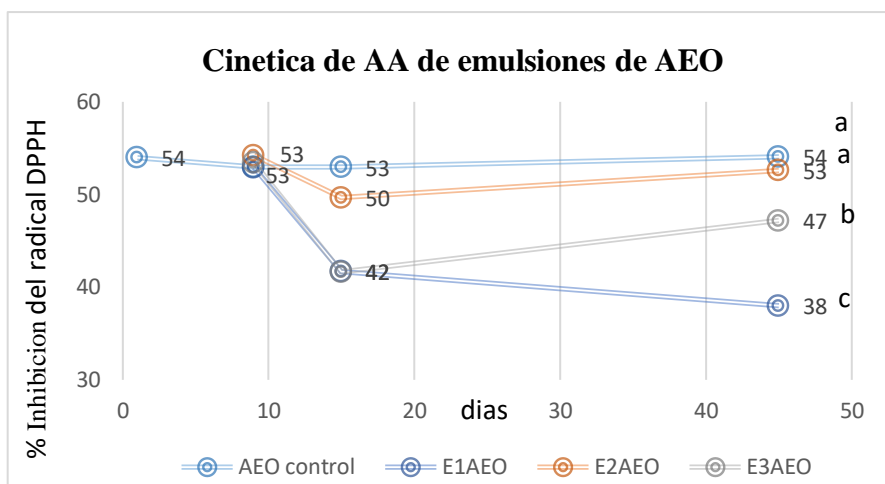


Figura 24. Porcentaje (%) de inhibición del radical DPPH en cinética de 45 días en emulsiones de AEO con diferentes relaciones de material de pared y AEO. Letras minúsculas diferentes representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

En estudios previos (Macías, *et al* 2019) se reporta la mejor inhibición del radical DPPH cuando las relaciones de material de pared y material a encapsular son de 1:1 y 2:1 lo cual coincide con nuestros resultados donde la emulsión E2AEO con relación 2:1 fue la formulación con mejor inhibición al radical DPPH.

Por otro lado el tamaño de partícula y la tasa de coalescencia son parámetros de estabilidad de una emulsión. Uno de los factores que afectaron el tamaño de partícula durante el tiempo (90 días) fue la concentración de sólidos (AEO+GA+Q) presente en las emulsiones, la E2AEO y la E3AEO debido a su mayor contenido de sólidos con 16.2 % y 19.2% respectivamente, presentaron un tamaño de partícula menor a 10 micras respecto a la emulsión E1AEO (Figura 25) con aproximadamente 40 micras de tamaño de partícula y que contenía una menor concentración de sólidos (10.6%), lo que favoreció un aumento en el tamaño de partícula con el paso de los días en la emulsión E1AEO, algunos autores reportan que conforme los tamaños de partícula van aumentando, normalmente contribuyen a la inestabilidad de una emulsión resultando con el tiempo en una separación de fases (Espinosa y García, 2017). Por otro lado de acuerdo al tamaño de partícula las emulsiones se pueden clasificar como macro emulsión cuando el diámetro se encuentra en el rango de 10 -100 $\mu$ m y nano emulsiones cuando el diámetro se encuentra en el rango de 20-100nm (Herrera, *et al.*, 2018).

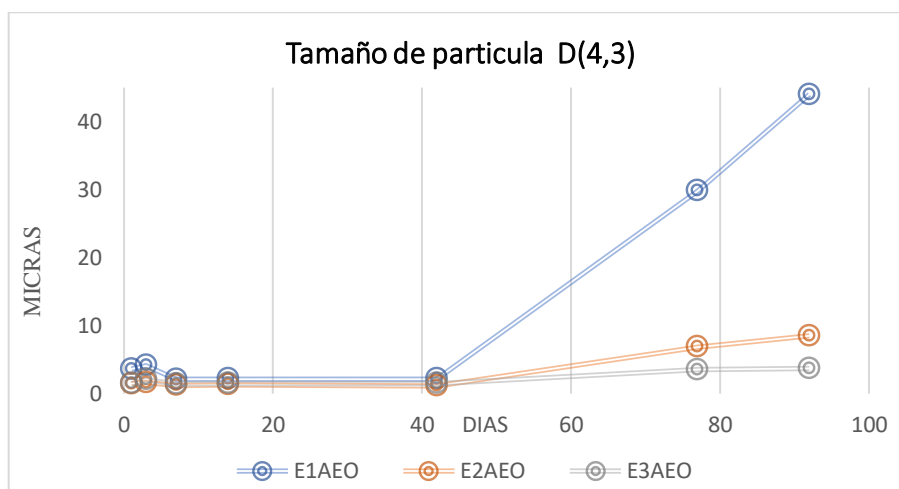


Figura 25. Tamaño de partícula en cinética de 90 días en emulsiones de AEO

Las emulsiones con valores de tasa de coalescencia comprendidos entre  $1 \times 10^{-7}$ -  $1 \times 10^{-9}$  se consideran “Muy estables” y valores de  $1 \times 10^{-6}$ -  $1 \times 10^{-7}$  como “Estables” y son consideradas como emulsión “Inestable” cuando los valores son menores a  $1 \times 10^{-5}$  (Pérez, *et al.*, 2011). La tasa de coalescencia obtenida dio como resultado en la E1AEO ser una emulsión “estable” y para las emulsiones E2AEO y E3AEO ser “muy estables”, resultando las 3 formulas en cuanto a estabilidad ser adecuadas para emulsionar el AEO. En los valores de potencial  $-\zeta$  los resultados en las 3 emulsiones fueron negativos (Tabla 10).

Tabla 10. Tasa de coalescencia y potencial  $\zeta$  en emulsiones de AEO

	Tasa de coalescencia		Potencial $-\zeta$
E1AEO	$1 \times 10^{-6}$	Estable	-11.2
E2AEO	$7 \times 10^{-7}$	Muy estable	-12.6
E3AEO	$3 \times 10^{-7}$	Muy estable	-11.0

Las emulsiones aceite en agua son una excelente opción para la utilización de aceites esenciales en la industria de alimentos y drogas, la estabilidad de una emulsión y sus propiedades funcionales están influenciadas en gran parte por la naturaleza de la fase oleosa, tipo de emulsificante, relación aceite/agua, tamaño de gota, carga y técnica utilizada (Herrera, *et al.*, 2018).

## 8.7 Emulsiones de AL con GA, GM y Q

La evaluación de la actividad antioxidante del AEO probada como la capacidad de protección contra la oxidación de ácidos grasos insaturados se realizó a diferentes dosis, se utilizó el AEO como aditivo antioxidante en una matriz de emulsiones de aceite en agua (O/W), se diseñaron 3 experimentos. Se utilizó aceite de linaza de origen nacional extra-virgen rico en ácido alfa linolénico el cual se obtuvo por prensado en frío y que contenía la siguiente composición de omega 3, 6 y 9 (Figura 26).

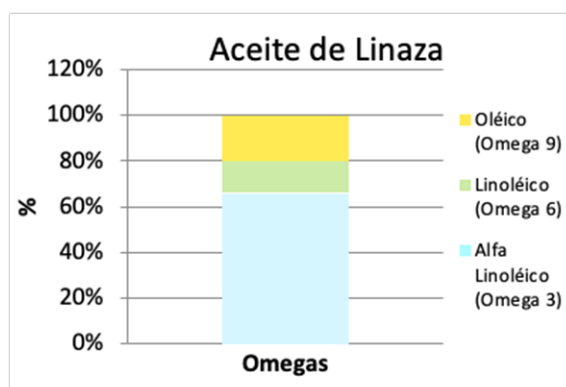


Figura 26. Porcentaje (%) de composición de omega 3, 6 y 9 (66, 14 y 20 % respectivamente) en aceite de linaza.

### 8.7.1 Diseño 1, Emulsiones de AL con GA y Q

Considerando los resultados obtenidos de la sección 8.4.2, se procedió a realizar las emulsiones de aceite de linaza (EAL) que fueron elaboradas con el método de deposición electrostática capa por capa (DCC), con una fase dispersa de  $\phi = 0.05$  y una relación de material emulsionante a aceite de linaza de 1:1. Se usaron concentraciones de 1200, 2400 y 7400 ppm de AEO para evaluarlo como aditivo antioxidante para proteger de la oxidación al AL en un sistema emulsionado, como referencia se usó el antioxidante sintético butil hidroxitolueno (BHT) en concentraciones de 30, 65 y 200ppm, se utilizó como control AL emulsionado con 0ppm de antioxidante. También se evaluó el aceite de linaza (AL) no emulsionado en 3 formas: sin antioxidantes, con BHT y con AEO.

Las emulsiones desarrolladas presentaban cantidades notables de ácidos grasos poliinsaturados, los cuales son especialmente propensos a la oxidación y para estudiar el estatus oxidativo de las emulsiones, se llevó a cabo la determinación de compuestos primarios y secundarios de oxidación, peróxidos y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) respectivamente.

El índice de peróxidos mide el estado de oxidación inicial de un aceite, se expresa en miliequivalentes de oxígeno activo por kilo de aceite de linaza. Los peróxidos o compuestos de oxidación inicial se originan si el aceite no se protege de la luz y el calor, o no se conserva en envases adecuados, como consecuencia de ello, a mayor índice de peróxidos menor será la capacidad antioxidante del AEO.

Los valores de hidroperóxidos mayores que los obtenidos en el control (0 ppm de antioxidantes) representan oxidación y valores menores indican protección contra la oxidación de los lípidos mono y poliinsaturados presentes en el AL.

Los resultados obtenidos de formación de hidroperóxidos en la cinética de oxidación de 40 días (Figura 27) mostraron que todas las EAL a partir del día 14 presentaron una mayor oxidación con valores superiores a 200 mg/kg hasta 1600mg/kg aproximadamente de hidroperóxidos, que el AL hasta el término de la cinética en el día 40. Mostrando que la velocidad de oxidación es mayor cuando el AL se encuentra en una emulsión.



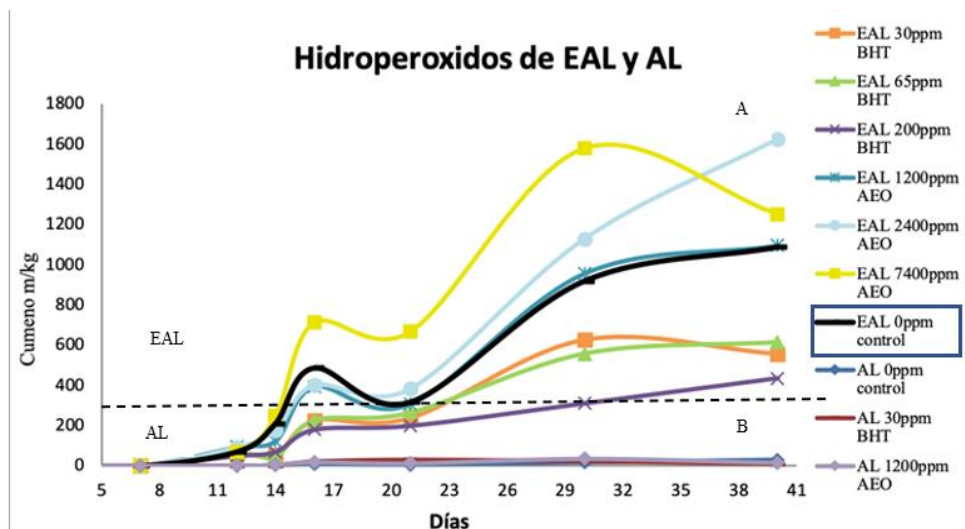


Figura 27. Formación de hidroperóxidos en cinética de 40 días en EAL y AL. Letras mayúsculas diferentes representan diferencias significativas entre las EAL y el AL ( $p < 0.05$ ).

En los resultados obtenidos de TBARS (Figura 28) mostraron un comportamiento similar en las EAL, pues presentaron mayor oxidación que el AL, al término de los 40 días de la cinética, con valores superiores a 50mg/kg hasta 300 mg/kg de malondialdehido (MA).

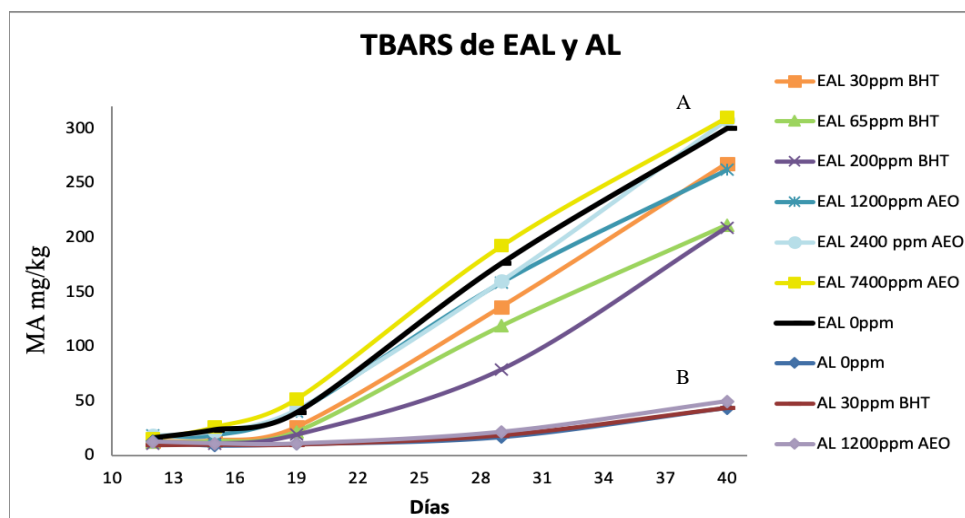


Figura 28. Formación de TBARS en cinética de 40 días en EAL y AL. Letras mayúsculas diferentes representan diferencias significativas entre las EAL y el AL ( $p < 0.05$ ).

Observando por separado el comportamiento durante la cinética de oxidación de las EAL, fue posible apreciar que las EAL adicionadas con AEO (Figura 29) mostraron una velocidad de formación de hidroperóxidos igual o mayor que la emulsión control de 0ppm,

por lo que las concentraciones utilizadas de AEO no mostraron un efecto antioxidante al no proteger contra la oxidación el AL y si presentaron un efecto prooxidante en concentraciones mayores a 1200ppm. En cambio, las emulsiones que contenían BHT mostraron un efecto antioxidante en las 3 dosis utilizadas. Por lo que la actividad antioxidante de la dosis (1200ppm) de AEO mostrada *in vitro* por el ensayo DPPH no mostro su potencial antioxidante durante la aplicación en una matriz lipídica rica en ácidos grasos insaturados como lo es el AL en un sistema de emulsión.

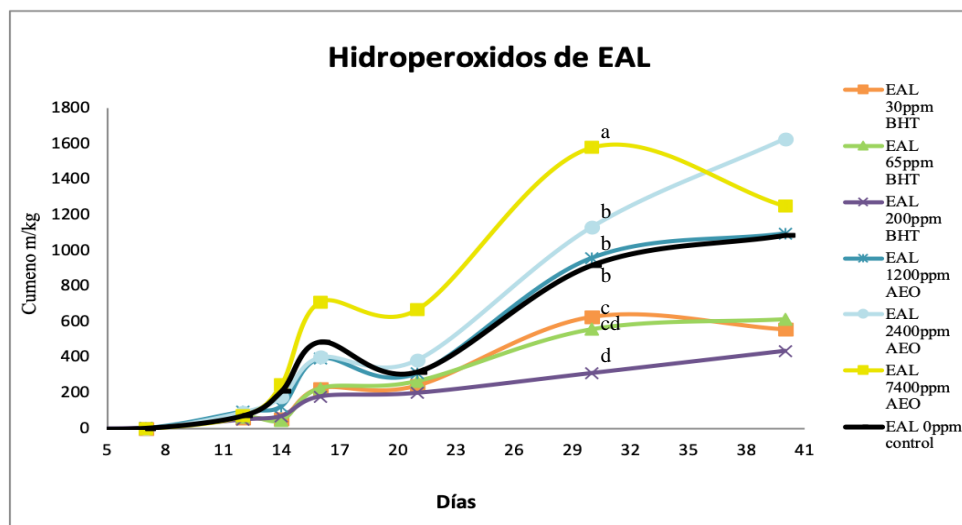


Figura 29. Formación de hidroperóxidos en cinética de 40 días en EAL. Letras minúsculas diferentes representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

En la gráfica de TBARS (Figura 30) la mayoría de las EAL adicionadas con AEO mostraron un comportamiento mayor de formación de TBARS respecto al control, sin embargo la EAL adicionada con 1200ppm de AEO, fue la concentración que presento una oxidación menor al control. Por otro lado, las EAL adicionadas con BHT presentaron una menor oxidación respecto al control durante el transcurso de la cinética. Derivado de los resultados obtenidos en la formación de hidroperóxidos y TBARS en el diseño 2 de experimentos se utilizaron concentraciones menores a 1200ppm de AEO.

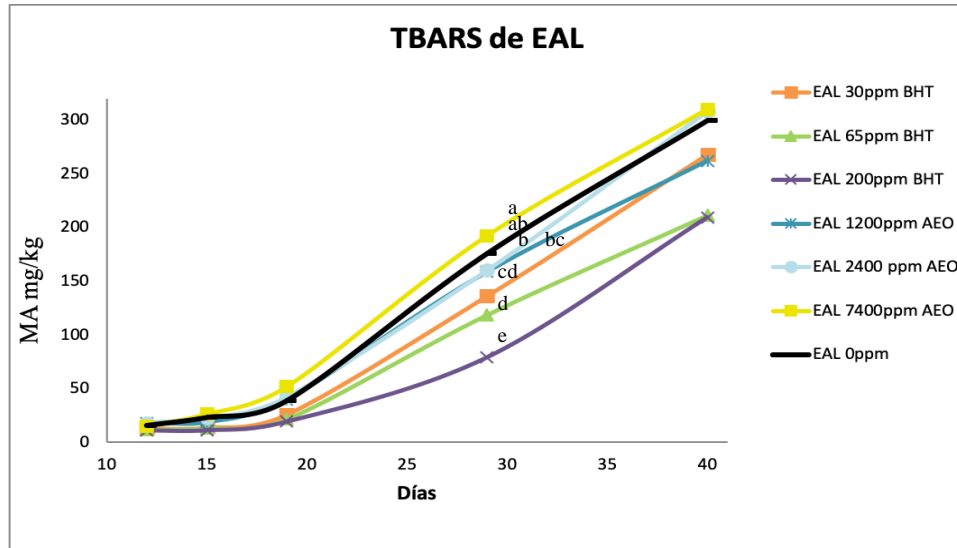


Figura 30. Formación de TBARS en cinética de 40 días en EAL. Letras minúsculas diferentes representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Observando por separado la cinética del AL adicionada con AEO 1200ppm y BHT 30ppm se observaron valores bajos de oxidación en un rango de 10 hasta 35 mg/kg de hidroperóxidos (Figura 31) lo cual al no ser un sistema emulsionado muestra una baja velocidad de oxidación en comparación de las EAL.

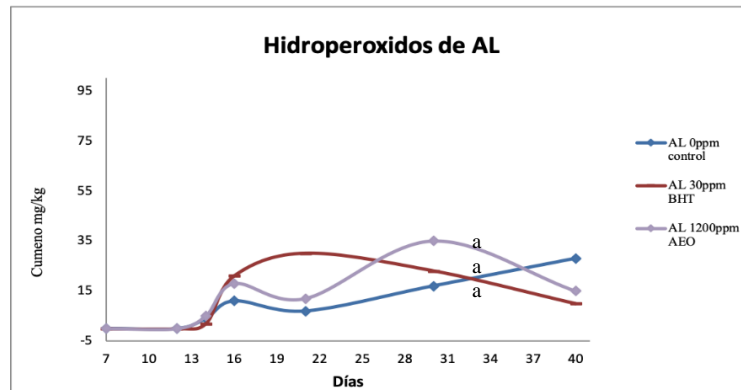


Figura 31. Formación de hidroperóxidos en cinética de 40 días en AL. Letras minúsculas diferentes representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Durante la formación de TBARS, en los 3 AL se presentaron valores en un rango de 10 a 50mg/kg MA los cuales son valores menores que los presentados en las EAL. (Figura 32).

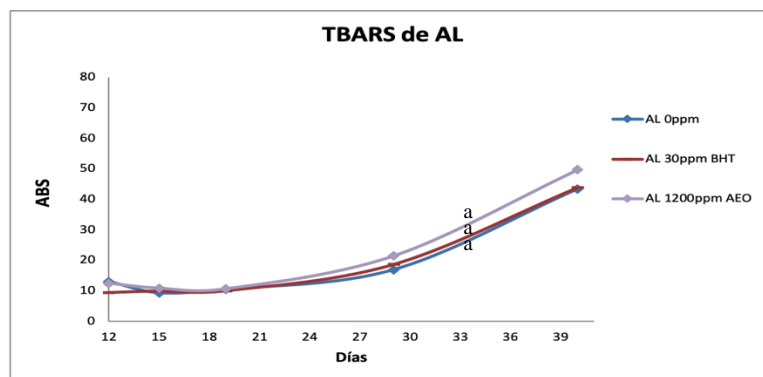


Figura 32. Formación de TBARS en cinética de 40 días en AL. Letras minúsculas diferentes representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

El potencial  $-\zeta$  fue negativo y no se determinó tamaño de partícula, tasa de coalescencia e índice de cremado.

### 8.7.2 Diseño 2, Emulsiones de Al con GM y Q

Se utilizaron concentraciones de 300, 600, 1200 y 2400ppm de AEO y una concentración de 30 ppm de BHT, en un total de 8 emulsiones, se evaluaron 2 métodos de elaboración de emulsiones de linaza, el método tradicional (MT) y el método de DCC, se utilizó goma de mezquite (GM) y Q con una fase dispersa  $\phi = 0.10$  y una relación de material de pared y AL de 1:1 en el MT y con una  $\phi = 0.05$  para el método DCC, como referencia se usó el antioxidante sintético BHT.

Los resultados de la cinética de formación de hidroperóxidos (Figura 33) mostraron que todas las EAL por MT presentaron una mayor oxidación que las EAL por método DCC. Es decir con valores superiores a 2000 mg/kg de hidroperóxidos en las emulsiones por MT mientras que los valores de las emulsiones elaboradas por el método DCC fueron por debajo de los 2000 mg/kg de hidroperóxidos. En las emulsiones por DCC se utilizaron biopolímeros de carga opuesta y la densidad de carga final fue positiva al lograrse una doble capa, la primera capa de carga negativa fue con la GM y la segunda capa de carga positiva con Q que resultó en una mejor protección del AL contra la oxidación.

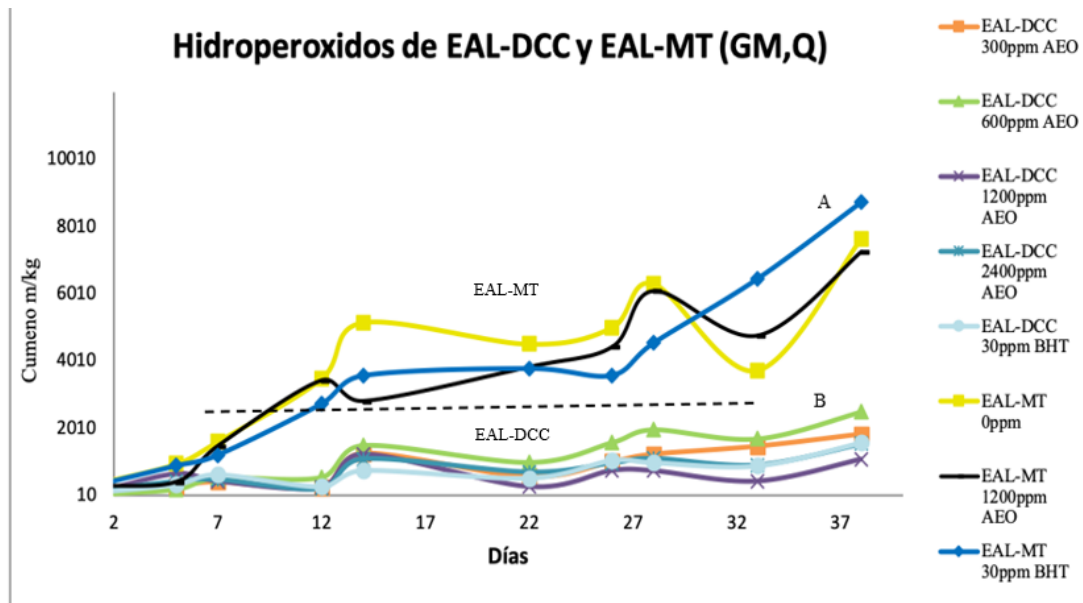


Figura 33. Formación de hidroperóxidos en cinética de 40 días en EAL-DCC y EAL-MT. Letras mayúsculas diferentes representan diferencias significativas entre los métodos DCC y MT ( $p < 0.05$ ).

Los resultados por el método de TBARS (Figura 34) mostraron una tendencia parecida, a partir del día 22 las EAL por MT presentaron mayor oxidación (hasta 100 mg/kg de MA) que las EAL por el método DCC, mostrando que el método DCC retarda mejor la oxidación que el MT.

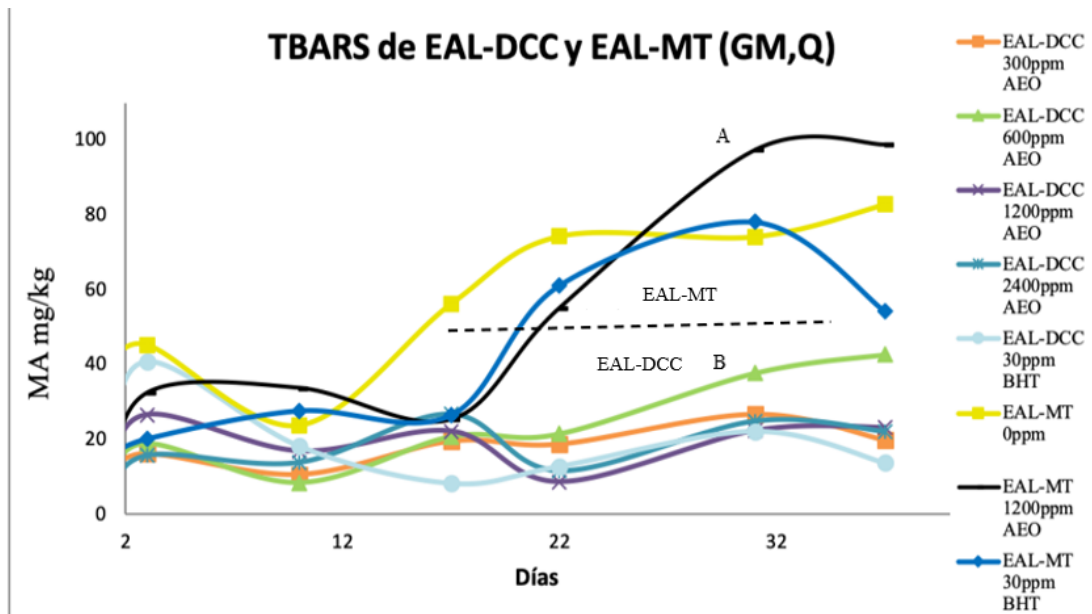


Figura 34. Formación de TBARS en cinética de 40 días en EAL-DCC y EAL-MT. Letras mayúsculas diferentes representan diferencias significativas entre los métodos DCC y MT ( $p < 0.05$ ).

Comparando por separado la cinética de oxidación (hidroperóxidos) de las EAL-DCC que fueron adicionadas con AEO (Figura 35) respecto a la EAL control con BHT 30ppm, la concentración de AEO que presentó mejor actividad antioxidante para proteger de la oxidación el AL fue la EAL-DCC con 1200 ppm mostrando esta concentración una mejor protección contra la oxidación a partir del día 22, lo cual se vio reflejado en una menor oxidación en el AL al término de la cinética. El resto de las emulsiones con AEO no mostraron una protección mayor contra la oxidación del AL respecto al control.

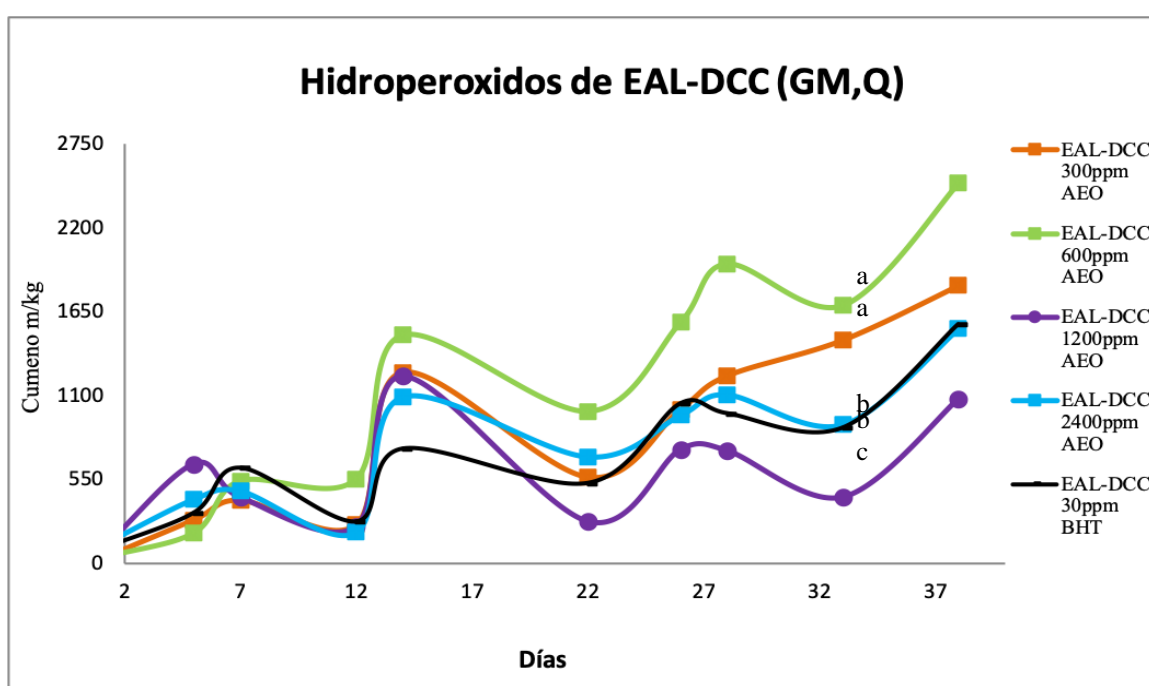


Figura 35. Formación de hidroperóxidos en cinética de 40 días en EAL-DCC. Letras minúsculas diferentes representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

En la gráfica de TBARS (Figura 36) al término de la cinética en el día 40 las EAL-DCC adicionadas con AEO a 300ppm, 1200ppm y 2400ppm mostraron actividad antioxidante similar respecto de la emulsión control, donde se observan valores en el rango de 12 hasta 28 mg/kg de MA es decir durante la cinética se observó un comportamiento de protección contra la oxidación similar al efecto antioxidante de la emulsión control de BHT a 30ppm.

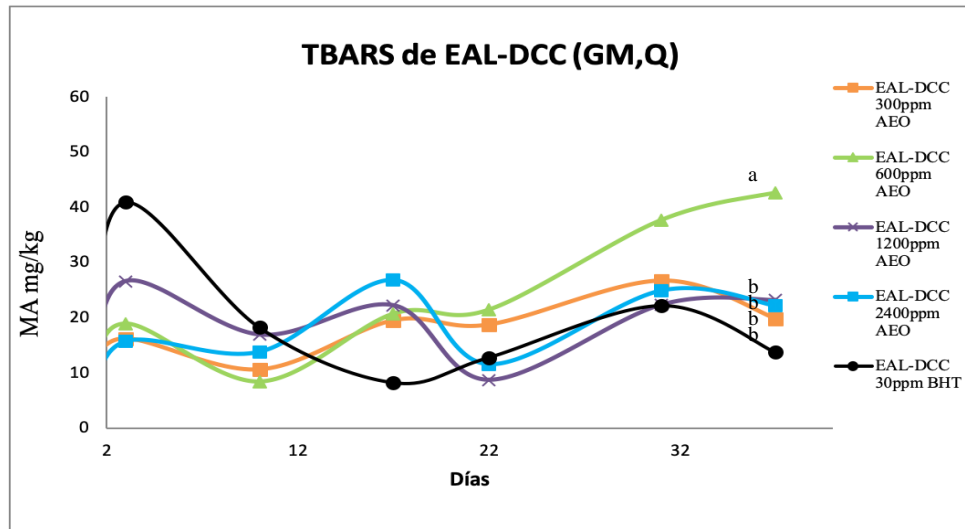


Figura 36. Formación de TBARS en cinética de 40 días en EAL-DCC. Letras minúsculas diferentes representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Los resultados de formación de hidroperóxidos en las EAL-MT al término de la cinética de 40 días mostraron valores de oxidación de aproximadamente 8000 mg/kg de hidroperóxidos los cuales se muestran en la Figura 55, los valores son mayores que los presentados en las EAL-DCC (Figura 37).

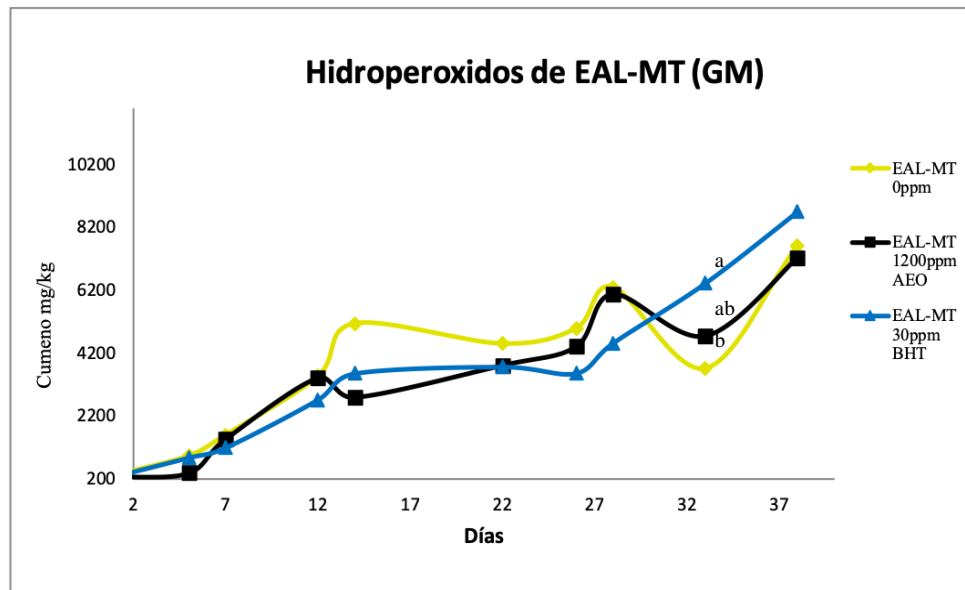


Figura 37. Formación de hidroperóxidos en cinética de 40 días en EAL-MT. Letras minúsculas diferentes representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Los resultados de formación de TBARS en EAL-MT mostraron valores de oxidación de aproximadamente 20 hasta 100 mg/kg de MA, los resultados se muestran en la gráfica de la Figura 38, también fueron valores mayores a las EAL-DCC.

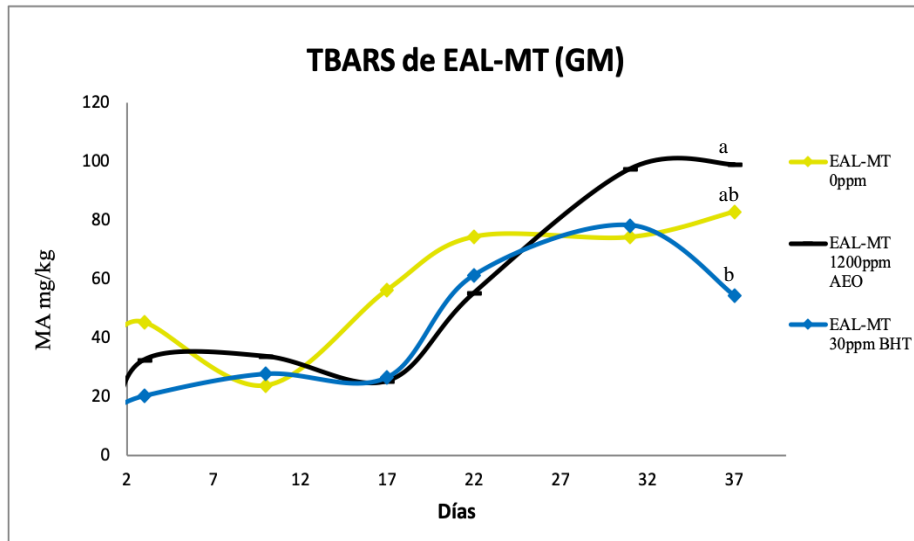


Figura 38. Formación de TBARS en cinética de 40 días en EAL-MT. Letras minúsculas diferentes representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

En las emulsiones el índice de cremado es un parámetro de estabilidad a menor valores obtenidos en el índice de cremado mayor es la estabilidad en una emulsión. En los resultados obtenidos el mayor porcentaje de cremado se presentó en las EAL-MT (Figura 39) con valores de 11% hasta 18% aproximadamente y en las EAL-DCC el valor aproximado máximo fue de 8% de cremado resultando en una mejor estabilidad de las emulsiones cuando se utiliza el método DCC, esto debido en parte por tener las EAL-DCC una (fase dispersa de aceite)  $\phi = 0.05$  y un 12% de sólidos de los cuales una parte es de Q que es un biopolímero de alta viscosidad que al estar presente aumenta la viscosidad dando mayor estabilidad a la emulsión, mientras que las EAL-MT (fase dispersa de aceite  $\phi = 0.10$ ) a pesar de tener una concentración mayor de sólidos (20%), estos corresponden al material de pared GM que es polímero de baja viscosidad aun en altas concentraciones y no contenían además Q las EAL-MT en su formulación.



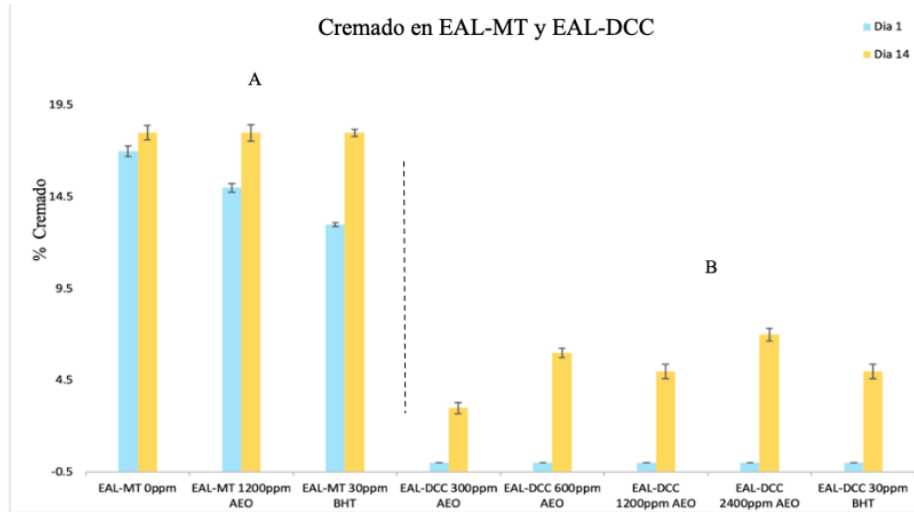


Figura 39. Porcentaje (%) de cremado en los días 1 y 14 en EAL-DCC y EAL-MT. Letras mayúsculas diferentes representan diferencias significativas entre los métodos DCC y MT ( $p < 0.05$ ).

Por otro lado las mediciones en el tamaño de partícula (Figura 40) de las EAL-MT y EAL-DCC no se presentó diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) se mantuvieron en la medida D (3,2) en un rango de aproximadamente 1.5 micras hasta 2.3 micras durante 18 días.

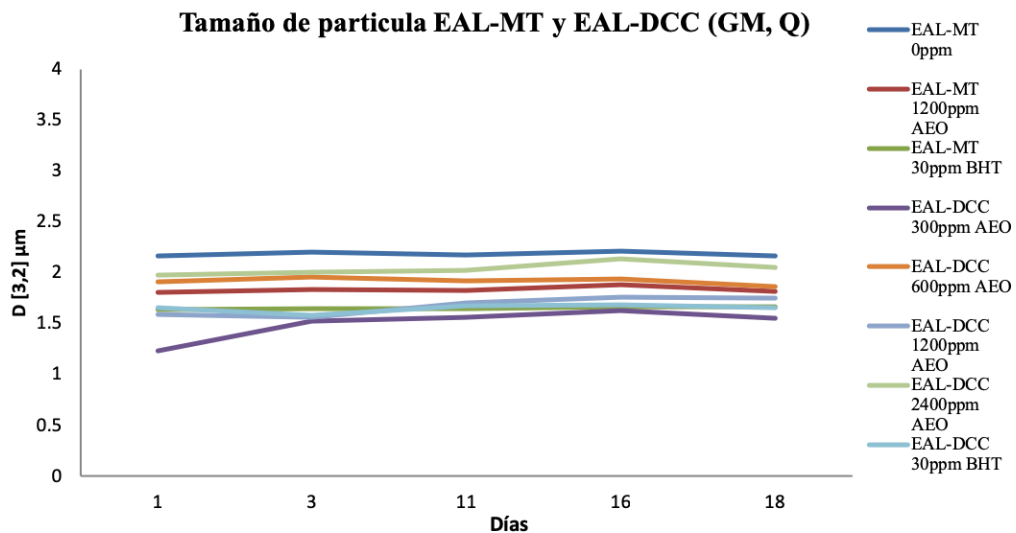


Figura 40. Tamaño de partícula en cinética de 18 días de EAL-DCC y EAL-MT. La ausencia de letras significa que no hay diferencia significativa en los métodos DCC y MT ( $p < 0.05$ ).

Partiendo de los valores de tamaño de partícula, y de acuerdo con los valores obtenidos de la tasa de coalescencia (Tabla 11) podemos decir que las EAL-MT y las EAL-DCC se categorizan todas como “Muy estables” (Pérez, *et al.*, 2011).

Tabla 11. Tasa de coalescencia y potencial  $\zeta$  en EAL-MT y EAL-DCC

	Tasa de coalescencia		Potencial $-\zeta$
EAL-MT 0ppm	$7 \times 10^{-9}$	Muy estable	Negativo
EAL-MT 1200ppm AEO	$3 \times 10^{-8}$	Muy estable	Negativo
EAL-MT 30ppm BHT	$3 \times 10^{-8}$	Muy estable	Negativo
EAL-DCC 300ppm AEO	$2 \times 10^{-7}$	Muy estable	+18.2
EAL-DCC 600ppm AEO	$1 \times 10^{-7}$	Muy estable	+18.2
EAL-DCC 1200ppm AEO	$2 \times 10^{-7}$	Muy estable	+18.2
EAL-DCC 2400ppm AEO	$1 \times 10^{-7}$	Muy estable	+18.2
EAL-DCC 30ppm BHT	$3 \times 10^{-8}$	Muy estable	+18.2

### 8.7.3 Diseño 3, Emulsiones de Al con GA y Q

En el diseño 3, con la finalidad de utilizar como material de pared a la GA y Q, se utilizaron las mismas dosis de AEO y BHT que en el diseño 2, las emulsiones fueron elaboradas con MT y DCC, con una fase dispersa,  $\phi = 0.05$  y una relación de material emulsionante a AL de 1:1 en MT y con una  $\phi = 0.025$  para DCC, como referencia se usó el antioxidante sintético BHT.

Durante la cinética de formación de hidroperóxidos (Figura 41) las 5 emulsiones AEL-DCC mostraron una menor oxidación que las 3 EAL elaboradas con MT por lo que la velocidad de oxidación del AL es menor cuando se utiliza el método DCC para elaborar emulsiones de aceite de linaza.

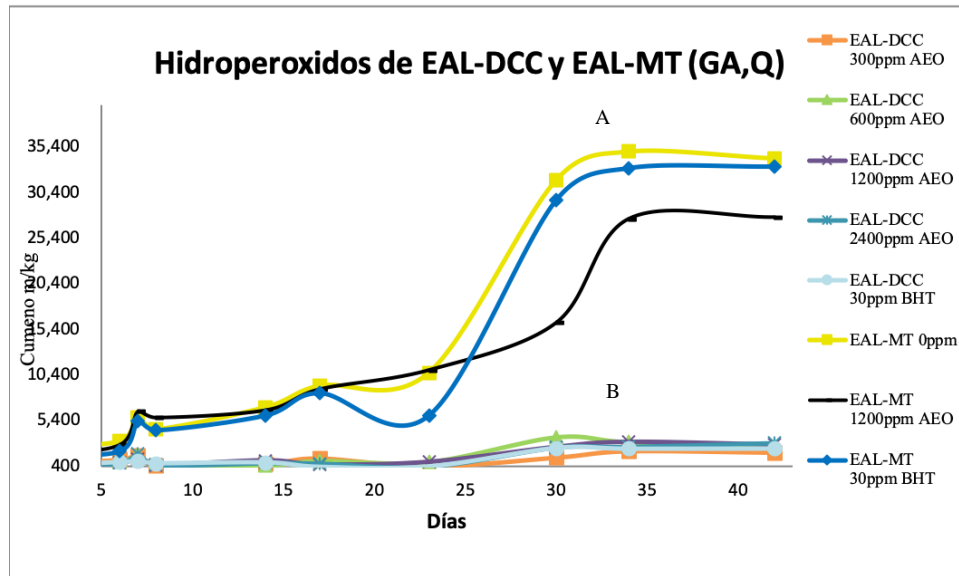


Figura 41. Formación de hidroperóxidos en cinética de 42 días de EAL-DCC y EAL-MT. Letras mayúsculas diferentes representan diferencias significativas entre los métodos DCC y MT ( $p < 0.05$ ).

Se puede observar también en la gráfica de TBARS (Figura 42) que las emulsiones por el método DCC mostraron una menor oxidación que las elaboradas con MT mostrando que la oxidación del AL también es menor cuando se utiliza el método DCC para elaborar emulsiones de aceite de linaza.

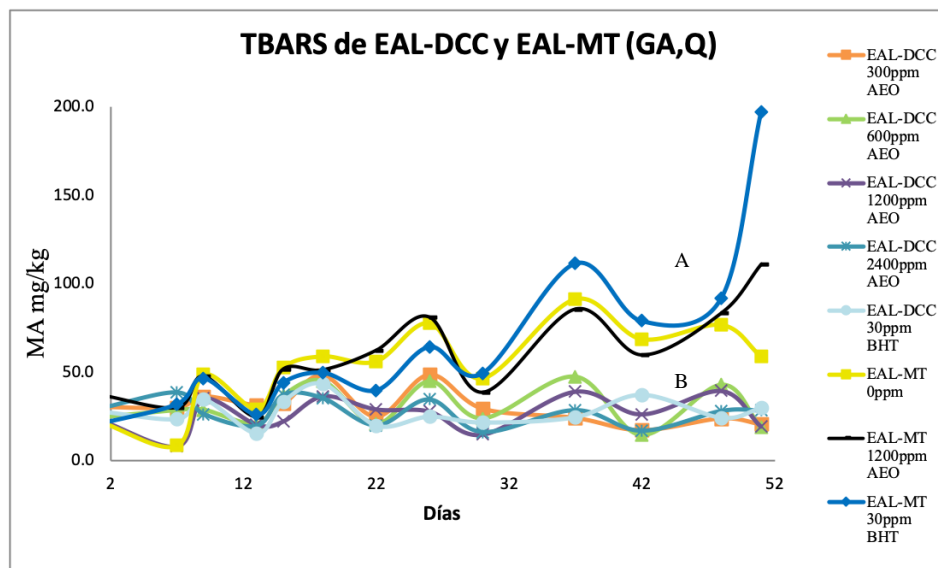


Figura 42. Formación de TBARS en cinética de 52 días de EAL-DCC y EAL-MT. Letras mayúsculas diferentes representan diferencias significativas entre los métodos DCC y MT ( $p < 0.05$ ).

Al revisar (Figura 43) por separado los resultados obtenidos de la formación de hidroperóxidos en las EAL-DCC, se observó que después del día 25 la emulsión que contenía la concentración de 300ppm de AEO mostro actividad antioxidante similar a la emulsión control adicionada de BHT a 30 ppm.

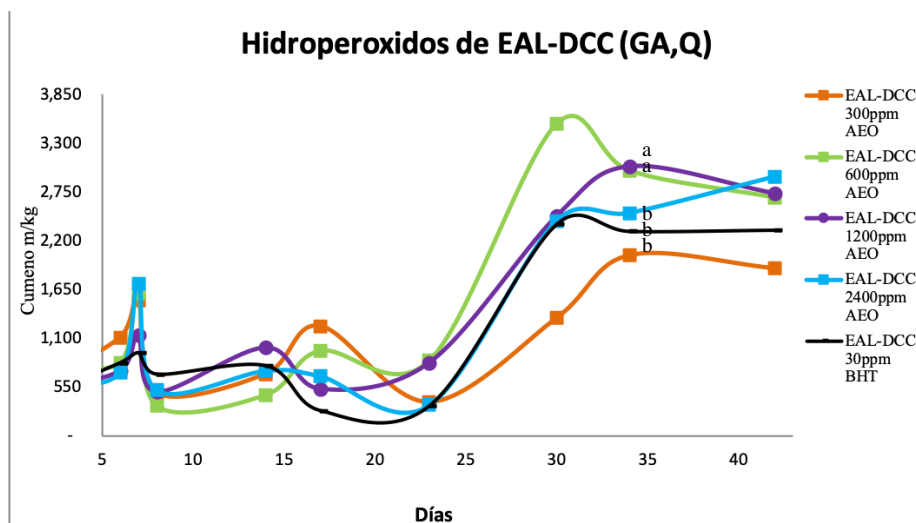


Figura 43. Formación de hidroperóxidos en cinética de 42 días de EAL-DCC. Letras minúsculas diferentes representan diferencias significativas ( $p<0.05$ ).

En la revisión de la gráfica de TBARS (Figura 44) de las EAL-DCC, se observó que las emulsiones tiene un comportamiento de protección contra la oxidación similar a la emulsión de control positivo que contiene BHT a 30ppm, los valores alcanzados en todas las emulsiones fueron menores a 50 mg/kg de MA.

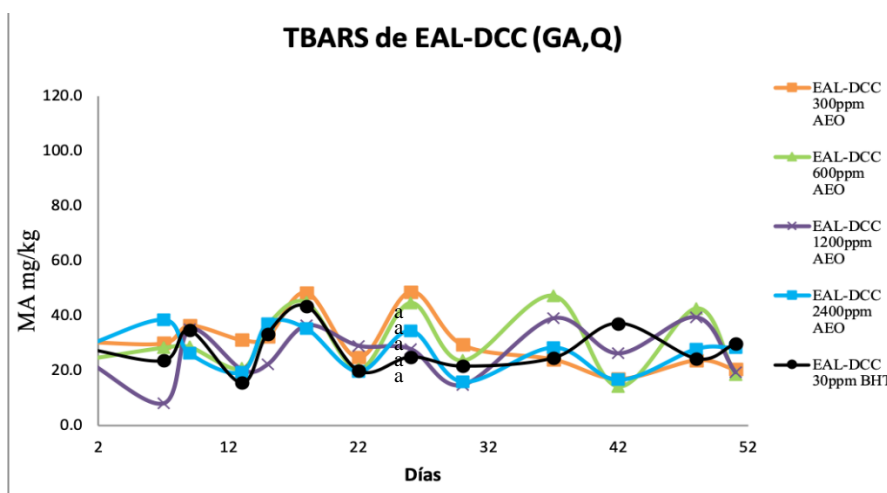


Figura 44. Formación de TBARS en cinética de 52 días de EAL-DCC. Letras minúsculas diferentes representan diferencias significativas ( $p<0.05$ ).

Para las emulsiones elaboradas por MT, la formación de hidroperóxidos fue menor en la emulsión que contenía 1200ppm de AEO en comparación con la emulsión control sin antioxidantes de 0ppm y también fue menor en comparación con la emulsión adicionada con 30ppm de BHT. La emulsión sin antioxidantes (0 ppm) mostro aproximadamente 35,000 mg/kg de hidroperóxidos al término de la cinética. (Figura 45)

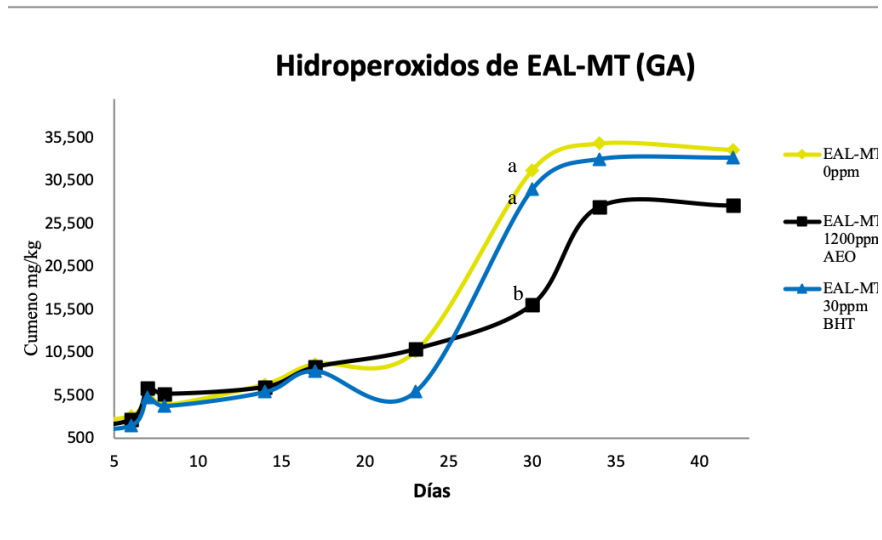


Figura 45. Formación de hidroperóxidos en cinética de 42 días de EAL-MT. Letras minúsculas diferentes representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

En los valores presentados de TBARS como MA (Figura 46), el proceso de oxidación fue similar en las 3 emulsiones durante el transcurso de la cinética alcanzando valores promedio aproximados a 100 mg/kg de MA.

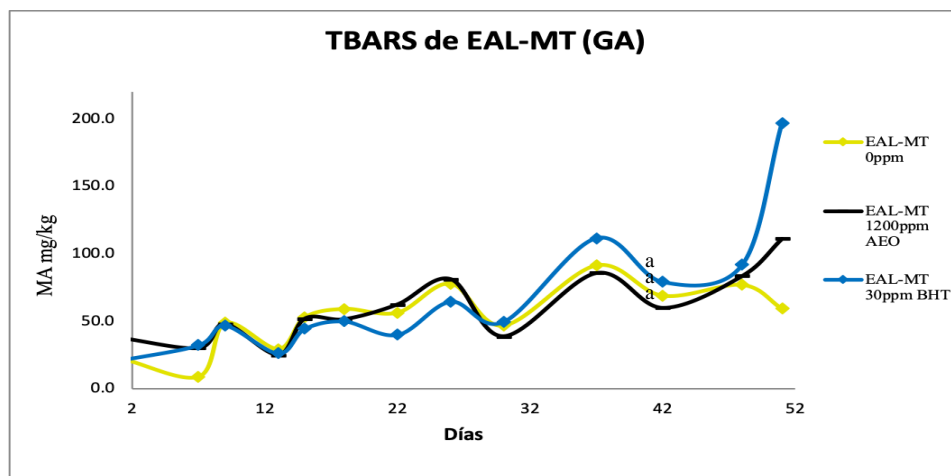


Figura 46. Formación de TBARS en cinética de 52 días de EAL-MT. Letras minúsculas diferentes representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

En cuanto a la estabilidad de las emulsiones como índice de cremado, el mayor porcentaje de cremado se presentó en las EAL-DCC con valores de 10%, esto puede ser debido a la fase dispersa  $\phi = 0.025$  que es un valor bajo y menor al utilizado en el diseño 2 de experimentos. En las EAL-MT la  $\phi = 0.05$  fue mayor y se observó un máximo de 6% de cremado resultando en una mejor estabilidad de las emulsiones (Figura 47).

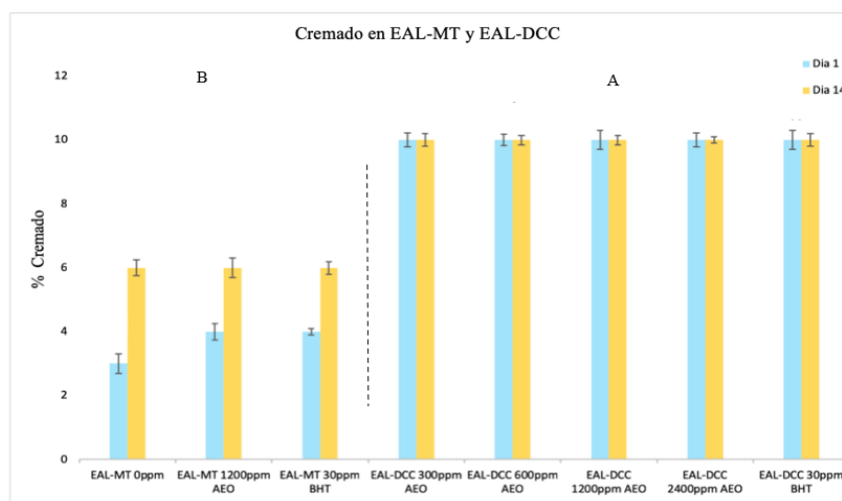


Figura 47. Porcentaje (%) de cremado en los días 1 y 14 en EAL-DCC y EAL-MT. Letras mayúsculas diferentes representan diferencias significativas entre los métodos DCC y MT ( $p < 0.05$ ).

En los resultados de obtenidos de las mediciones del tamaño de partícula (Figura 48) las mediciones fueron menores en las EAL-MT con un rango de medida D(3,2) de

aproximadamente 1.5 micras hasta 2.0 micras mientras que las obtenidas en las EAL-DCC se encuentran en el rango de entre 7 y 10, esto puede ser debido a que tuvieron un valor de fase dispersa bajo  $\phi$  0.02. A Mayores valores de  $\phi$  se obtiene un menor tamaño de partícula (Cortés *et al.*, 2017).

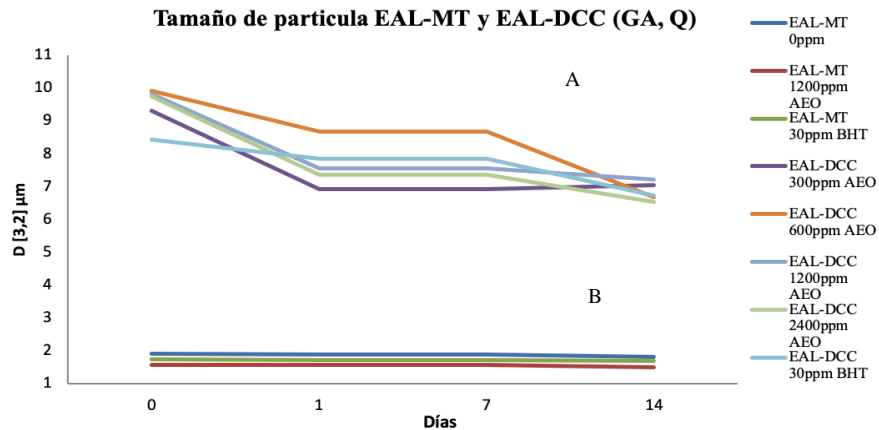


Figura 48. Tamaño de partícula en cinética de 18 días de EAL-DCC y EAL-MT. Letras mayúsculas diferentes representan diferencias significativas entre los métodos DCC y MT ( $p < 0.05$ ).

El tamaño de partícula influye en el índice de cremado, a mayores tamaños de partícula se puede predecir una pobre estabilidad y por consecuencia un aumento en el índice de cremado (Cardoso, *et al.* 2021). Mas sin embargo cuando se analizaron los datos de acuerdo con los valores obtenidos de la tasa de coalescencia (Tabla 12) la clasificación obtenida para las EAL-MT y las EAL-DCC fue de “Muy estables” y “Estables” respectivamente.

Tabla 12. Tasa de coalescencia y potencial  $\zeta$  en EAL-MT y EAL-DCC

	Tasa de coalescencia		Potencial $-\zeta$
EAL-MT 0ppm	$2 \times 10^{-7}$	Muy estable	Negativo
EAL-MT 1200ppm AEO	$1 \times 10^{-7}$	Muy estable	Negativo
EAL-MT 30ppm BHT	$7 \times 10^{-8}$	Muy estable	Negativo
EAL-DCC 300ppm AEO	$9 \times 10^{-7}$	Muy estable	+22.2
EAL-DCC 600ppm AEO	$1 \times 10^{-6}$	Estable	+22.2
EAL-DCC 1200ppm AEO	$9 \times 10^{-7}$	Muy estable	+22.2
EAL-DCC 2400ppm AEO	$1 \times 10^{-6}$	Estable	+22.2
EAL-DCC 30ppm BHT	$7 \times 10^{-7}$	Muy estable	+22.2

## 8.8 Formulación de emulsiones para secado de AEO para obtener potencial $-\zeta$ positivo (+)

Para obtener una densidad de carga positiva (potencial  $-\zeta$ ) y de esta manera lograr aumentar la protección del AEO, se elaboraron 4 emulsiones con diferentes porcentajes de quitosano (polisacárido catiónico) respecto a la goma arábica (polisacárido aniónico) por el método DCC (Figura 49).

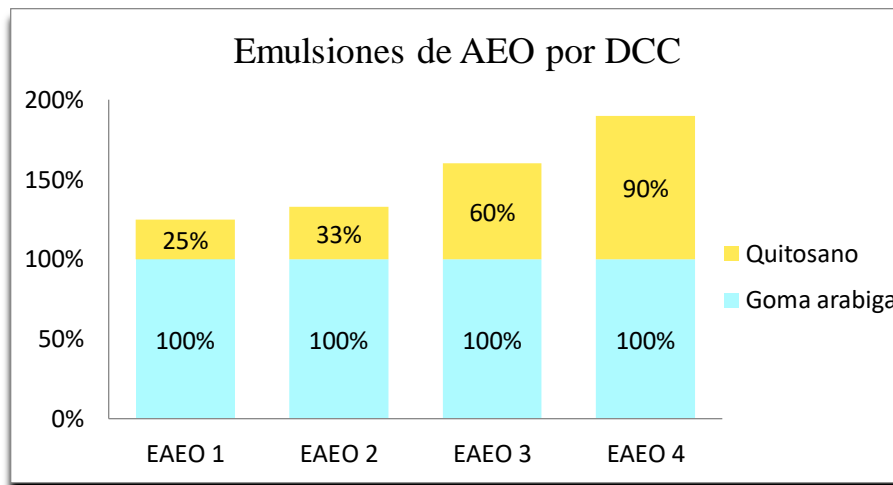


Figura 49. Emulsiones elaboradas por el método DCC con diferentes cantidades de GA y Q.

Los resultados obtenidos dieron una densidad de carga positiva cuando se utilizaron cantidades mayores al 33% de quitosano respecto a la goma arábica con valores en el potencial  $-\zeta$  de +0.09 hasta +26.80 (Figura 50). El potencial  $-\zeta$  es la carga general del sistema y su valor es un índice de la potencial estabilidad física de la emulsión, un valor grande positivo o negativo, las partículas se repelerán entre sí y el sistema se considera estable (Ramírez, *et al* 2019).



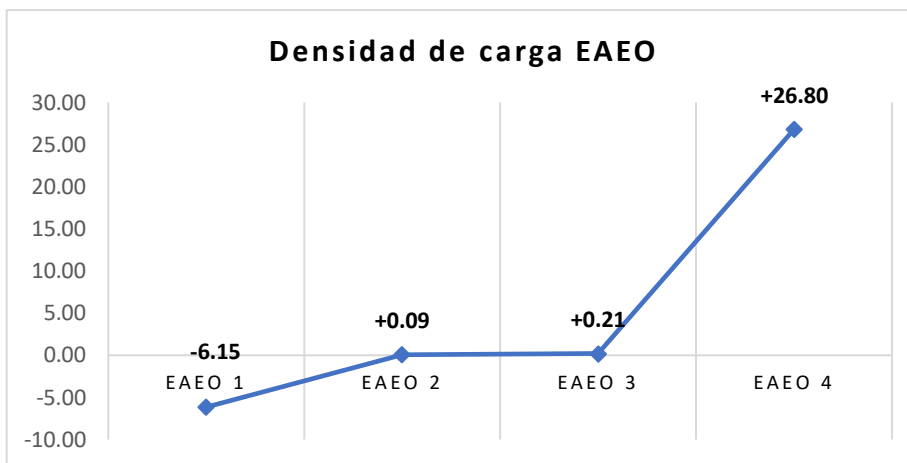
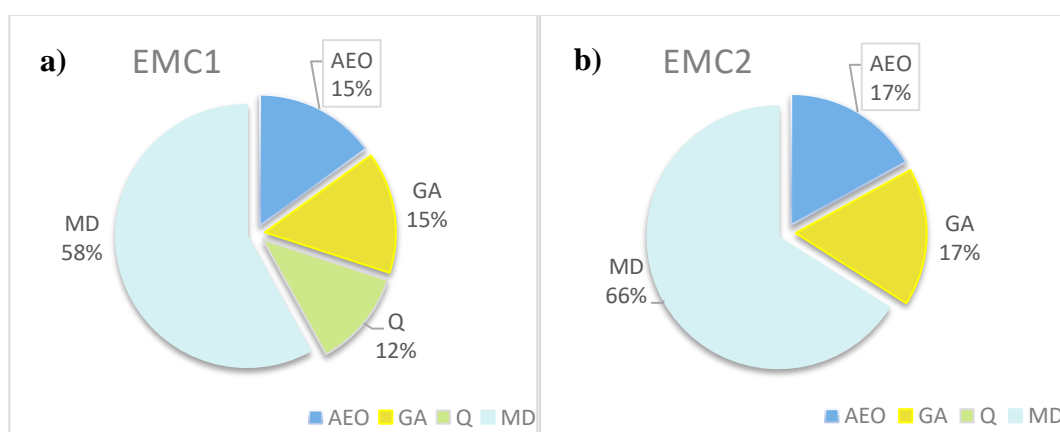


Figura 50. Densidad de carga (potencial  $-\zeta$ ) con diferentes porcentajes (%) de GA y Q.

## 8.9 Obtención de microcápsulas

### 8.9.1 Elaboración de emulsiones de AEO para secado

Para la elaboración de emulsiones para microcápsulas (EMC) se utilizaron GA y maltodextrina (MD) con diferentes porcentajes y relaciones de material de pared en 4 formulaciones. La EMC1 se elaboró por método DCC y se le añadió Q de acuerdo con los resultados obtenidos en la sección 8.8 para obtener una densidad de carga positiva mayor a +20.0. Las EMC2, EMC3 y EMC4 se elaboraron por MT y se utilizó GA, la relación de AEO y de material de pared fue de 1:1, 1:2 y 1:3 (Figura 51).



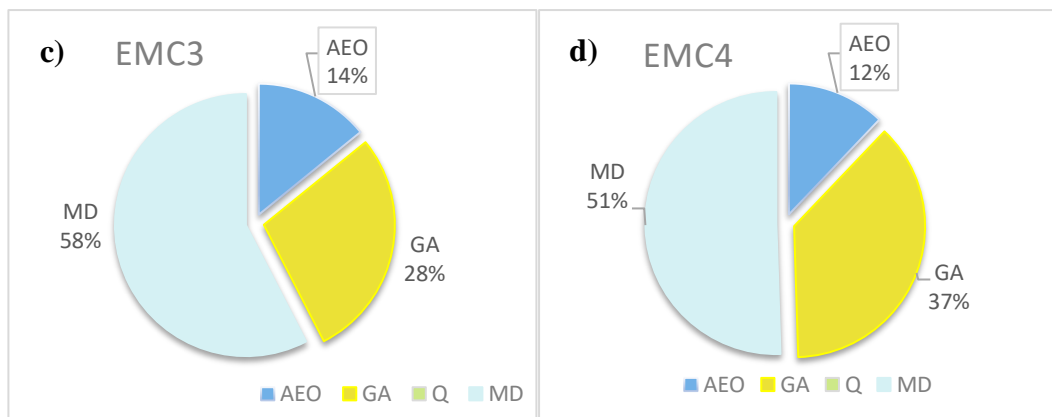


Figura 51. Formulas en base seca de emulsiones de AEO para obtener microcápsulas. a) MC1, b) MC2, c) MC3 y d) MC4.

### 8.9.2 Características fisicoquímicas y micrografías de microcápsulas (MC) de AEO

Las microcápsulas de AEO fueron obtenidas por un secador modelo Turbo Spray en las instalaciones de la UAEM en Toluca Edo. de Mexico (Universidad Autónoma del Estado de Mexico) (Figura 52). Las emulsiones para secado de aceite esencial de orégano se alimentaron al secador por aspersion, y se utilizaron condiciones de temperatura de entrada de  $160^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  y a una temperatura de salida de  $80^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ , con una presión de atomización de 3.5 bar.



Figura 52. Obtención de microcápsulas por Spray Dry.

Las características fisicoquímicas medidas de las microcápsulas obtenidas como Aw, % de humedad y color dieron como resultado valores de Aw en rangos de 0.2991 y 0.4506, para humedad valores de 5.30% a 7.59% y en color en el parámetro X (86.18-87.92), en Y (91.12-93.36) y en Z de (91.13-96.29) como se indica en la Tabla 13. Se ha reportado valores de hasta 5.1% de humedad para microcápsulas de orégano donde a mayor concentración de sólidos producen polvos con un contenido de humedad más bajo, y a menor concentración de sólidos polvos con una humedad mayor (Asensio, *et al.*, 2017).

Tabla 13. Características fisicoquímicas de microcápsulas (MC)

	<b>Características Físicoquímicas</b>				
	Aw	% Humedad	Color		
			X	Y	Z
MC1	0.4506±0.001	5.76±0.28	86.18±0.03	91.12±0.02	91.13±0.02
MC2	0.43640±.001	7.59±0.32	88.31±0.34	93.36±0.31	96.29±0.13
MC3	0.2991±0.000	5.30±0.21	87.92±0.04	92.87±0.01	95.80±0.26
MC4	0.3752±0.000	5.34±0.45	87.37±0.04	92.10±0.10	94.74±0.04

Promedio n= 3

La morfología en las microcápsulas es el resultado del efecto de la composición química y estructural del material encapsulante y de los parámetros de secado, durante el proceso de encapsulación. Es característico en las microcápsulas producidas mediante el secado por aspersión encontrar microcápsulas de forma esférica y en ocasiones esferas irregulares (Rivas, 2010).

En las micrografías obtenidas de las 4 fórmulas de microcápsulas de AEO se puede observar que la MC1 presenta formas casi esféricas o irregulares con una superficie abollada o dentada, esto debido al encogimiento de las partículas durante el proceso de secado el cual puede ocurrir a bajas y altas temperaturas, en bajas temperaturas hay una menor difusión del agua y las partículas tienen más tiempo para encogerse y a altas temperaturas la rápida evaporación y alta presión dentro de las partículas producen

encogimiento. En la mayoría de los casos las micropartículas se muestran colapsadas o encogidas, como se observa en la Figura 53. Trabajos anteriores han aclarado que solo las estructuras sin orificios son capaces de atrapar el aceite activo de manera efectiva (Baiocco, *et al.*, 2021) con este fin, la adición de un agente coadyuvante como la maltodextrina resulta beneficioso para el relleno de posibles vacuolas superficiales que se pudieran formar.

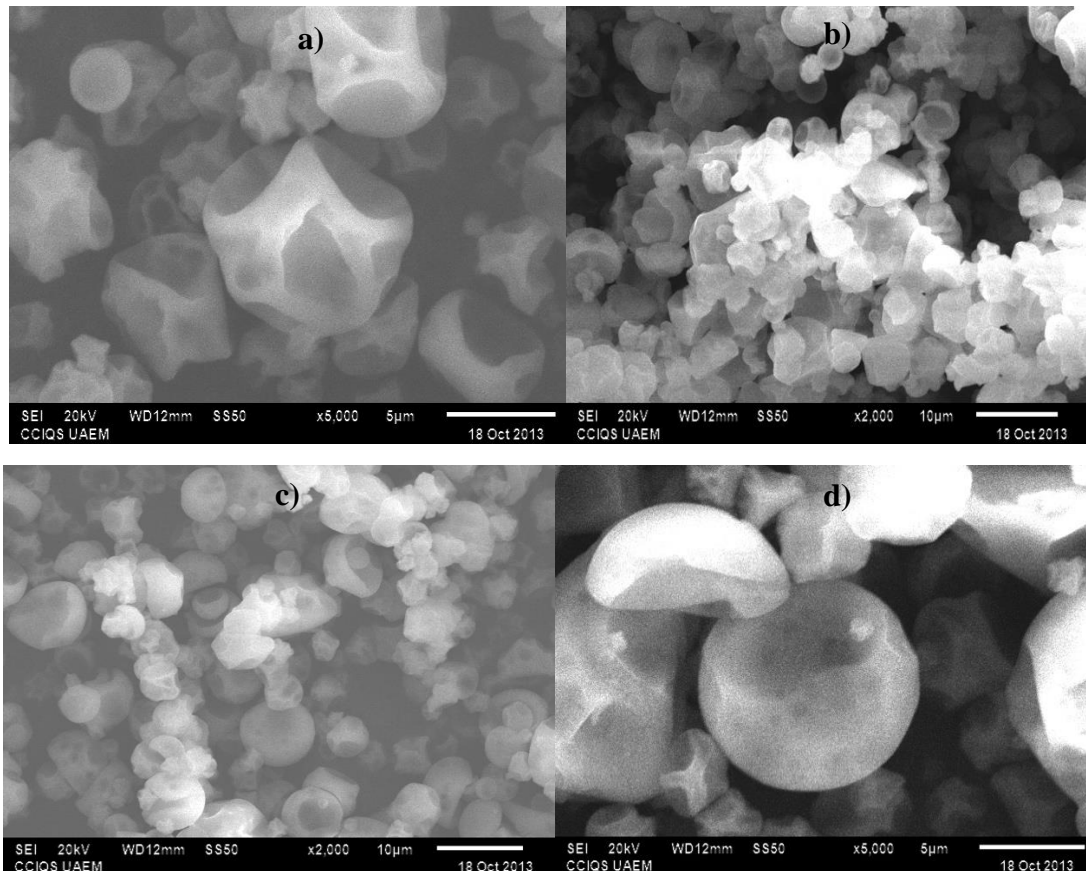


Figura 53. Micrográficas de microcápsulas de AEO, a) MC1, b) MC2, c) MC3, d) MC4

En la formula MC4 que contiene una relación de material de pared y AEO de 3:1 se observan formas esféricas con mayor grado de integridad que el resto de las microcápsulas, se observa también la presencia de una superficie más lisa y esférica y no se observan grietas en la superficie las cuales se forman por difusión violenta de gases durante el secado, al no observarse grietas y poros es un buen indicador de la eficiencia de secado.

### 8.9.2.1 Distribución y tamaño de partícula de microcápsulas

Se considera, como estable no tener tamaños de partícula mayores a 100 micras, los valores obtenidos para las 4 fórmulas de microcápsulas son de un rango promedio de 0.673 a 0.837 micras como se puede observar en la Figura 54.

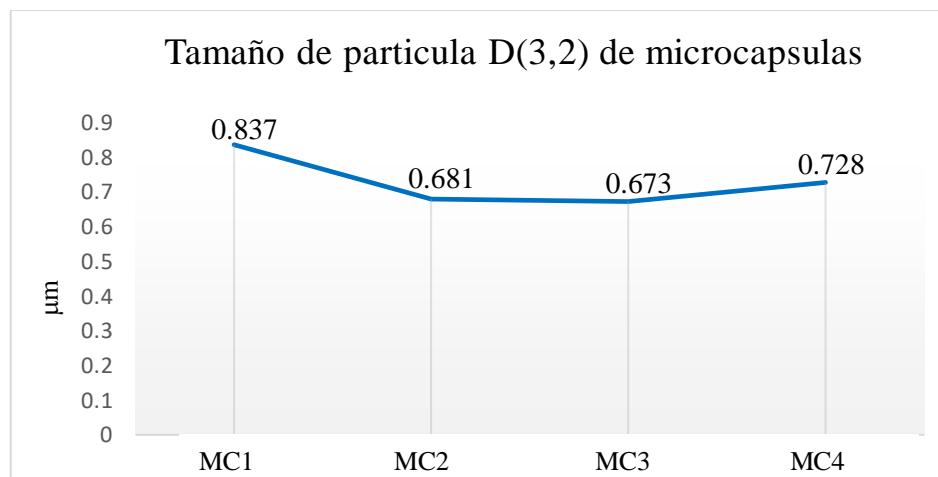


Figura 54. Tamaño de partícula de microcápsulas. n= 3

La grafica obtenida de distribución del tamaño de partícula de las microcápsulas mostro distribuciones homogéneas en las 4 fórmulas de microcápsulas con tamaños de 0.1 hasta 50 micras y el mayor volumen como porcentaje (%) de densidad fue en el rango de 0.5 a 1.0 micras, como se presenta en la Figura 55.

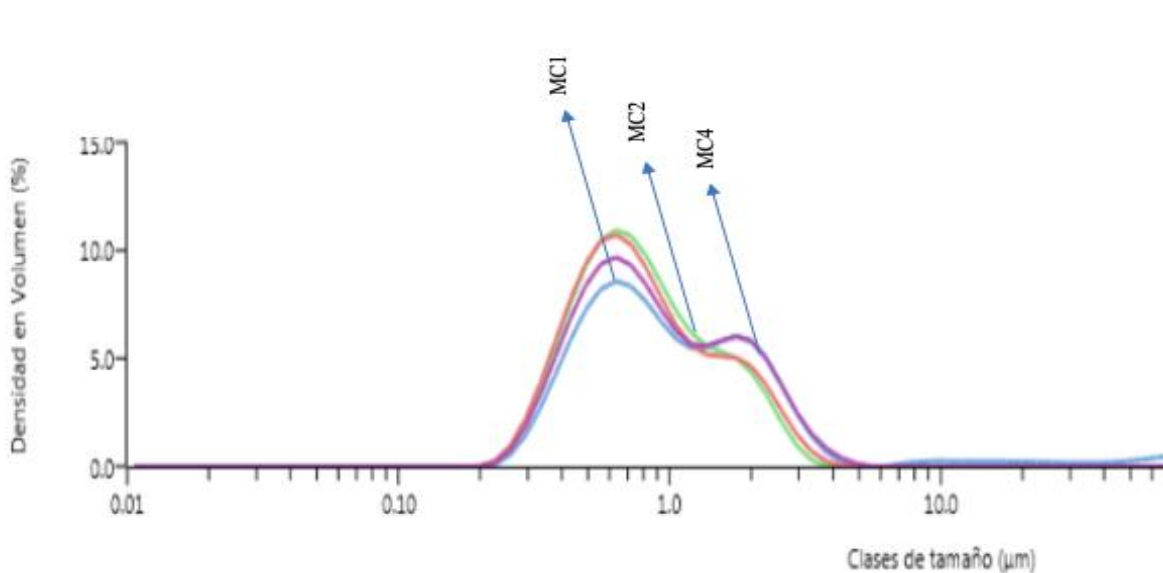


Figura 55. Distribución de tamaño de partícula de microcápsulas como densidad en volumen (%)

En la distribución de tamaño de partícula se desea un comportamiento monomodal, es decir que presente 1 pico en la grafica de distribución de tamaño de partícula, lo cual a largo plazo favorece una mejor estabilidad (Ramírez, *et al.*, 2019).

### 8.9.3 Retención total de AEO (RT), eficiencia de microencapsulación (ME) y potencial- $\zeta$ de microcápsulas.

Los resultados obtenidos muestran que la MC1 tuvo la mayor retención total de AEO con un 50% de retención, la DCC y el potencial  $-\zeta$  positivo (+ 24.2) de la formula, mejoraron la retención total de AEO en las microcápsulas, mientras que las microcápsulas que fueron formuladas por el MT y con potencial  $-\zeta$  negativo la RT fue menor con valores de 38% hasta 11% como se observa en la Tabla 14. La eficiencia de microencapsulación fue mayor a 92% en los 4 formulados de microcápsulas.

Tabla 14. Retención total de AEO (RT) y eficiencia de microencapsulado (ME)

	<b>RT</b>	<b>ME</b>	<b>Potencial-<math>\zeta</math></b>
MC1	50±3 <sup>a</sup>	99.57±1.0 <sup>a</sup>	+24.2±0.24
MC2	11±2 <sup>c</sup>	92.63±1.7 <sup>b</sup>	-15.2±0.15
MC3	31±5 <sup>b</sup>	94.56±2.1 <sup>b</sup>	-13.0±0.65
MC4	38±4 <sup>b</sup>	97.18±2.3 <sup>a</sup>	-14.4±0.82

Promedio de n=3 y desviación estándar. Letras minúsculas diferentes dentro de las columnas representan diferencias significativas (p<0.05).

Los valores de RT son similares a lo reportado con mezclas de goma arábica y maltodextrina con retenciones de aceite de 45.4 % y con mezclas de goma arábica, almidón modificado e inulina porcentajes de retención de 29 a 56 (Fernandes, *et al.*, 2014).

La mayor pérdida de aceite esencial de orégano se observó en las MC2 con 89% de perdida como se muestra en la Figura 56, la cual contenía una relación de pared y AEO de 1:1, y significativamente disminuyo la perdida de AEO al aumentar la relación de material de

pared respecto al AEO de 2:1 en la MC3, perdiendo menos (69%) cantidad de aceite esencial de orégano que la relación 1:1 de la MC2, al aumentar en la MC4 la relación de pared a 3:1 no hay diferencia significativa en la pérdida de AEO de las microcápsulas MC3 y MC4 por lo que un aumento de material de pared mayor a 2:1 aumentaría innecesariamente el costo total por una mayor adición de GA en la formulación, por lo que la formulación de MC3 tiene un mejor aprovechamiento de la GA que la formulación de MC4 para la retención total de aceite esencial de orégano.

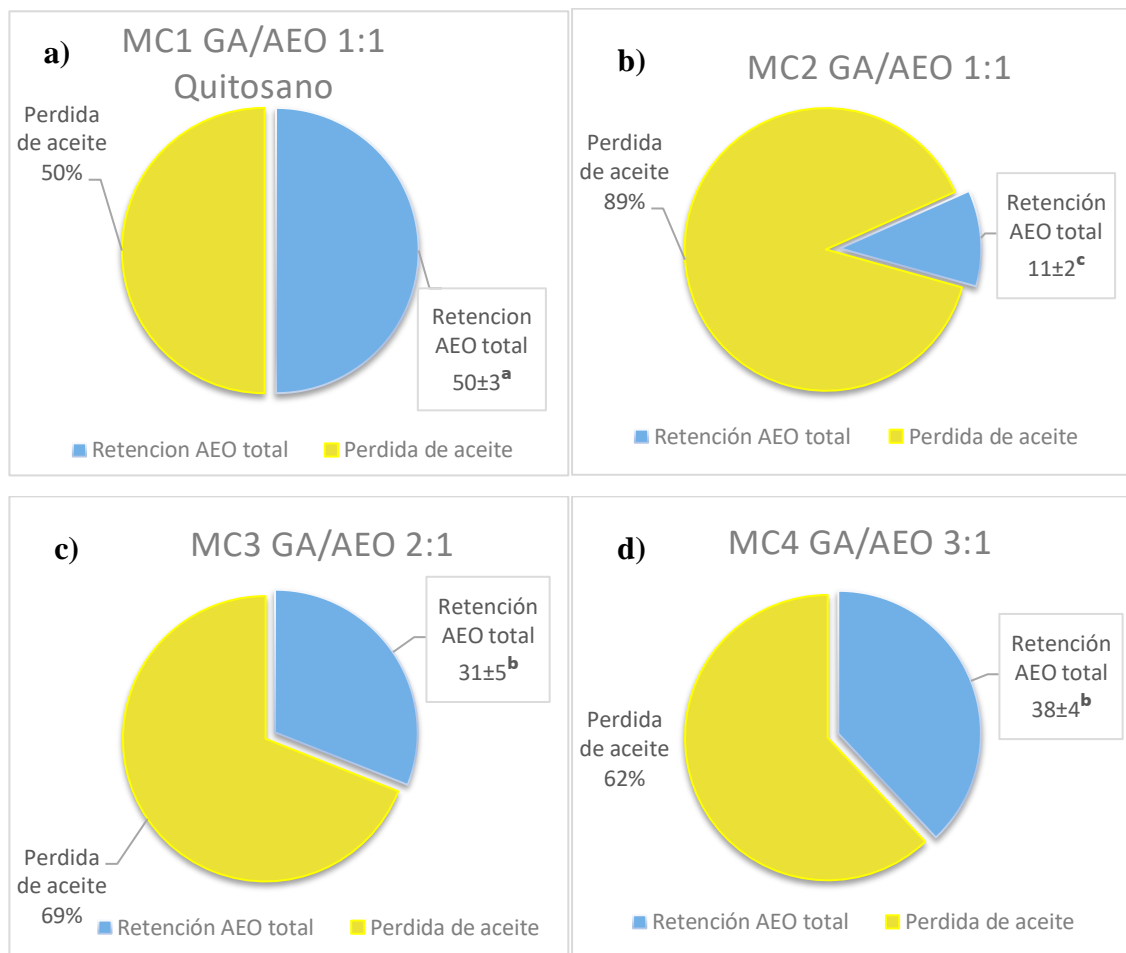


Figura 56. Pérdida de AEO y Retención total de AEO en microcápsulas. a) MC1, b) MC2, c) MC3 y d) MC4. Letras minúsculas diferentes representan diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

En estudios de producción de microcápsulas de aceite de orégano (Da costa, et al., 2013), se ha reportado que las formulas que contienen GA y MD en mayor proporción fueron

más apropiadas en la microencapsulación de aceite esencial de orégano mejorando la eficiencia de microencapsulación y estabilidad de la micropartícula.

#### 8.9.4 Contenido de timol y carvacrol e identificación de componentes mayoritarios de las microcápsulas de AEO

En la Tabla 15 los contenidos de timol y carvacrol en el AEO utilizado antes de la formación de microcápsulas fue de 16.96% y 28.54% respectivamente, después del proceso de secado el AEO microencapsulado no presentó diferencia significativa en el timol y carvacrol inicial, lo que muestra que durante el proceso de secado no se alteró la composición porcentual de timol y carvacrol en el AEO retenido en las microcápsulas.

Tabla 15. Porcentaje de Carvacrol y timol en AEO sin encapsular y AEO microencapsulado

	<b>Carvacrol (%)</b>	<b>Timol (%)</b>
Aceite AEO	28.54±2.09 <sup>a</sup>	16.96±3.18 <sup>a</sup>
MC1	27.43±0.15 <sup>a</sup>	18.08±0.10 <sup>a</sup>
MC2	28.07±0.11 <sup>a</sup>	17.44±0.14 <sup>a</sup>
MC3	27.40±0.35 <sup>a</sup>	18.11±0.12 <sup>a</sup>
MC4	27.52±1.00 <sup>a</sup>	17.98±0.13 <sup>a</sup>

Letras minúsculas diferentes dentro de las columnas representan diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

El cromatograma obtenido del AEO antes de encapsular mostro la identificación de los siguientes componentes mayoritarios (en orden de aparición) gama-terpineno, endo borneol, carvacrol metil eter, timol, carvacrol, carvacril acetato y cariofileno. Se puede observar (Figura 57) que los picos mayoritarios corresponden a 3 componentes: carvacrol, gama terpineno y timol.



## Identificación de componentes CG (Aceite de orégano sin encapsular)

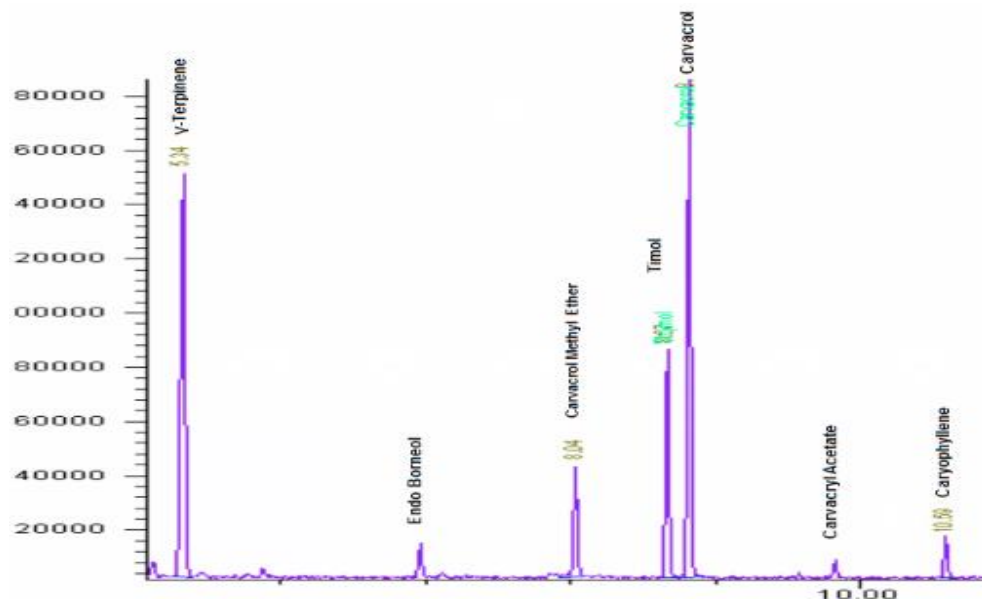
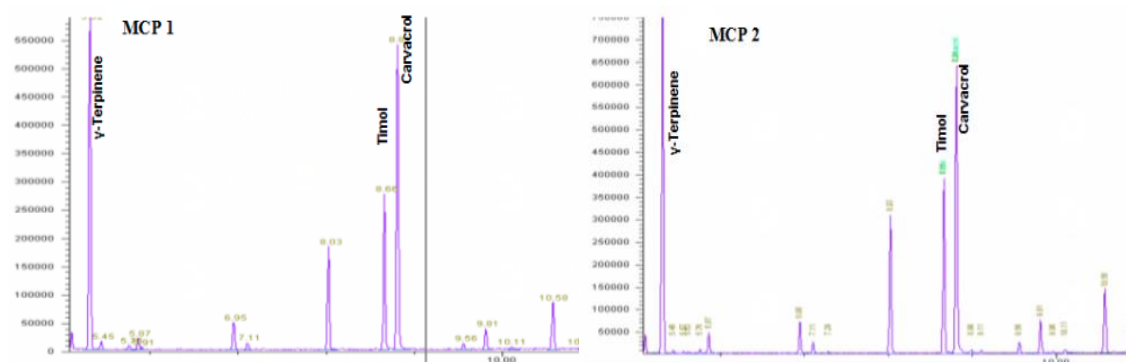


Figura 57. Cromatograma de AEO antes de la microencapsulación

Al comparar el AEO sin encapsular contra el AEO contenido en las microcápsulas después del proceso de secado, se aprecia que no hubo alteración como volatilización o pérdida de los compuestos más volátiles durante el secado que afectara la relación o proporción de los componentes mayoritarios como se observa en la Figura 58.



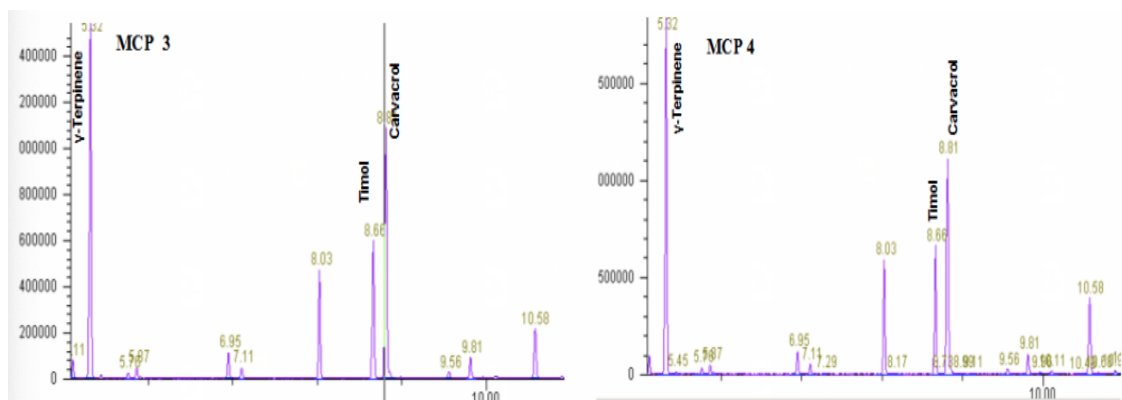


Figura 58. Cromatograma de AEO microencapsulado.

La identificación de compuestos volátiles en AEO no encapsulado y AEO retenido en las microcápsulas mediante la comparación de sus tiempos de retención y de sus espectros de masas (Tabla 16), mostraron en % de áreas relativas que el monoterpeno hidrogenado gamma terpineno es el primer componente mayoritario, seguido por carvacrol y timol respectivamente, también se identificaron monoterpenos oxigenados como endo borneol, carvacrol metil eter, carvacril acetato y como sesquiterpeno hidrogenado al *trans*-cariofileno y también como sesquiterpeno oxigenado el óxido de cariofileno. En general en la identificación de componentes del AEO no encapsulado y encapsulado, aproximadamente el 50% o más de los componentes pertenecen a monoterpenos oxigenados.

Tabla 16. Composición media en áreas relativas %, (n=3) de compuestos volátiles en AEO y AEO retenido en microcápsulas

	AEO	MC1	MC2	MC3	MC4
<b>Monoterpeno Hidrogenado (MH)</b>					
Gamma terpineno	37.70	31.14	28.50	34.07	34.65
<b>Monoterpeno Oxigenado (MO)</b>					
Borneol	ND	2.77	2.68	2.58	2.32
Carvacrol methyl ether	8.28	9.91	11.38	10.17	10.80
Timol	15.21	14.42	14.06	13.04	11.90
Carvacrol	36.33	28.58	24.48	24.78	22.6
Carvacryl acetato	ND	ND	ND	1.93	1.88
<b>Sesquiterpeno Hidrogenado (SH)</b>					
<i>Trans</i> - Cariofileno	ND	4.83	5.58	5.18	7.74

<b>Sesquiterpeno Oxigenado (SO)</b>					
Oxido de cariofileno	ND	ND	ND	1.15	ND
Total de componentes mayoritarios	97.52	91.65	86.68	92.97	91.89
Otros componentes	2.48	8.35	13.32	7.03	8.11
<b>MH</b>	37.70	31.14	28.50	34.07	34.65
<b>MO</b>	59.82	55.68	52.60	52.57	49.50
<b>SeH</b>	ND	4.83	5.58	5.18	7.74
<b>SeO</b>	ND	ND	ND	1.15	ND

Compuestos listados en orden de elución de cromatografía. Promedio n=3

### 8.9.5 Actividad antioxidante de microcápsulas de AEO

Se midieron en la MC1, MC3, MC4 y en el AEO no encapsulado como control, la actividad antioxidante (AA) como % de inhibición del radical DPPH del AEO contenido en las microcápsulas (Figura 59), se observó que independiente del método de emulsión (MT o DCC) y las distintas formulaciones no hubo una pérdida significativa de la AA del AEO durante la formación de microcápsulas, es decir la AA se conservó sin cambios significativos en los 3 formulados durante el proceso de secado para la obtención de las microcápsulas. En la MC2 no se determinó la AA por la no disponibilidad de muestra.

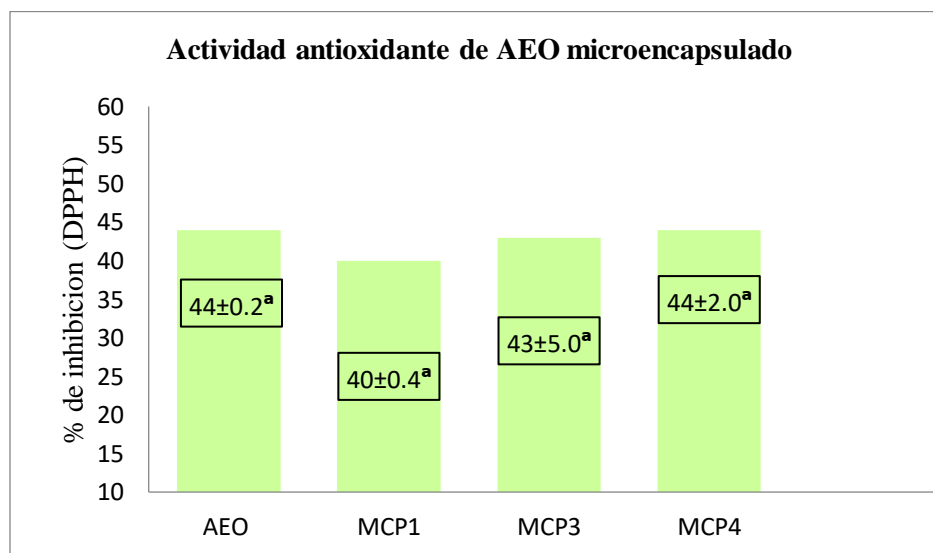


Figura 59. Actividad antioxidante de AEO contenido en microcápsulas como porcentaje de inhibición del radical DPPH a una concentración fija de 1200 mg/kg de AEO. Letras minúsculas iguales no representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Una adecuada formulación de las emulsiones tendrá un efecto positivo en la obtención de microcápsulas y protección del AEO, formulas con bajas proporciones de material de pared y AEO tendrán una menor estabilidad y menor conservación de las propiedades funcionales y formulas con una mayor proporción de material de pared (2:1) mantendrán por mas tiempo su estabilidad y propiedades funcionales (Ascensio, *et al.*, 2017).

## 9.0 CONCLUSIONES

La mejor temporada para obtener un mayor rendimiento de aceite esencial de orégano cultivado es en el otoño (septiembre). En los métodos de evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* en el ensayo DPPH se presentó la mayor actividad antioxidante en muestras de hojas de orégano de durante el verano (junio) y en los ensayos de ABTS y ORAC la mejor actividad antioxidante en el orégano se consigue en la temporada de otoño (septiembre) y la mayor concentración de polifenoles se presenta en las hojas. En la cuantificación de los timol y carvacrol la mayor concentración se presentó en las hojas de orégano de la temporada de otoño (septiembre). En metodologías para la elaboración de emulsiones el método de 2 etapas (DCC) protege mejor de la oxidación a los ácidos grasos del AL también concentraciones de aceite de orégano mayores a 1200ppm en emulsiones, pueden presentar un efecto prooxidante y concentraciones de aceite de orégano menores a 1200ppm en emulsiones, presenta un efecto antioxidante. En la elaboración de microcápsulas el MCP1 (GA/Aceite Orégano 1:1 + Quitosano) obtuvo la mayor retención de aceite total con 50% de retención, no se encontraron diferencias significativas en las relaciones de timol y carvacrol en el aceite de orégano antes de encapsular y el aceite de orégano contenido en los 4 formulados de MCP. La actividad antioxidante se conservó sin cambios significativos en el aceite esencial de orégano antes y después de encapsular es decir los formulados para obtener microcápsulas conservan sin cambios significativos la actividad antioxidante presente en el aceite esencial de orégano. En cuanto a la composición del aceite de las MCP además de timol y carvacrol como componentes mayoritarios se encontró  $\gamma$ -Terpinene, Carvacrol methyl ether, Endo Borneol, Carvacryl Acetate y Caryophyllene.

## 10. PERSPECTIVAS

En base en los hallazgos de esta investigación se puede establecer en que temporada se pueden obtener los mayores rendimientos de aceite de orégano cultivado, también se puede aprovechar el aceite esencial obtenido del residuo del proceso de secado de las plantas de orégano. Por otro lado para diversificar los usos del aceite de orégano es recomendable en lo futuro adecuar y optimizar la metodología de elaboración de emulsiones de aceite esencial de orégano en matrices alimenticias u otras matrices como un aditivo antioxidante.

## 11.0 BIBLIOGRAFIA

Abuashwashu Manal. 2018. Estudio analítico y de la actividad antioxidante de "*Rosmarinus officinalis*" L. de la Península Ibérica, Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia, Madrid, España.

Acevedo, D., Navarro, M., & Monroy, L. 2013. Composición Química del Aceite Esencial de Hojas de Orégano (*Origanum vulgare*). Información Tecnológica, 24(4), 9–10. <http://doi.org/10.4067/S0718-07642013000400005>.

Adams A., Kruma Z., Verhe R., De Kimpe N., Kreichbergs V. 2010. Volatile Profiles of Rapeseed Oil Flavored with Basil, Oregano, and Thyme as a Function of Flavoring Conditions. Journal AOCS, 10.1007/s11746-010-1661-3.

Alanis G., 2008. Evaluación de poblaciones de "Orégano Nuevo León "*Poliomintha longiflora* Gray, del norte de Nuevo León, México. *Revista de Salud Pública y Nutrición*. RESPYN U.A.N.L., No.1, Vol. 10: trabajo No.1.

Alizadeh, A., & Shaabani, M. 2014. Essential oil composition, total phenolic content, and antioxidant activities of Iranian *Zataria multiflora* Boiss. *International Journal of Biosciences*, 4(4), 97-104.

Amorati Riccardo, Foti Mario C, Valgimigli Luca. 2013. Antioxidant Activity of Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61 (46), 10835-10847 DOI: 10.1021/jf403496k.

AOAC. 1996. Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists. (16th ed.). Washington: AOAC International.

Aranda Ruiz J., R. Silva Vázquez y D.I. Franco Hernández. 2009. Caracterización del aceite esencial de orégano liso (*Poliomintha longiflora* Gray) de la localidad Infiernillo en el municipio de Higuera, N.L., México. *RESPYN* 10(1): 1-5.

Arango B., O., Pantoja, D., & Santacruz, L. 2012. Actividad antioxidante del aceite esencial de orégano (*Lippia Origanoides* h.b.k) del alto Patia. *Biotecnología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial: BSAA*, 10(2), 79–86.

Arcila C., Loarca G., Lecona S. González E. 2004. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Revista Latinoamericana de Nutrición ALAN*, Volumen 54: No.1 p.100-111.

Asensio, C.M.; Grosso, N.R.; Juliani, H.R. 2015. Quality characters, chemical composition and biological activities of oregano (*Origanum spp.*) essential oils from central and southern Argentina. *Ind.Crop. Prod.* 63, 203–213.

Asensio CM, Paredes AJ, Martin MP, Allemandi DA, Nepote V, Grosso NR. (2017) Antioxidant Stability Study of Oregano Essential Oil Microcapsules Prepared by Spray-Drying. *J Food Sci.* Dec;82(12):2864-2872. doi: 10.1111/1750-3841.13951.

Bález G, J., 2008. Evaluación termofísica de los materiales utilizados en emulsiones y microcápsulas y análisis de su efecto en el retardo de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados del aceite de linaza. Tesis Doctoral. UAM. Mexico.

Baiocco Daniele, Preece Jon A., Zhang Zhibing. 2021. Microcapsules with a fungal chitosan-gum Arabic-maltodextrin shell to encapsulate health-beneficial peppermint oil, *Food Hydrocolloids for Health*, Volume 1, 100016, ISSN 2667-0259, <https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2021.100016>

Beirão da Costa et al., S. Beirão da Costa, C. Duarte, A.I. Bourbon, A.C. Pinheiro, A.T. Serra, M. Moldão Martins, M.I. Nunes Januário, A.A. Vicente, I. Delgadillo, C. Duarte, M.L. Beirão da Costa. 2012. Effect of the matrix system in the delivery and in vitro bioactivity of microencapsulated oregano essential oil *J. Food Eng.*, 110 (2), pp. 190-199, [10.1016/j.jfoodeng.2011.05.043](https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.05.043)

Bendini, A.; Cerretani, L.; Pizzolante, L.; Toschi, T.G.; Guzzo, F.; Ceoldo, S.; Marconi, A.M.; Andretta, F.; Levi, M. 2006. Phenol content related to antioxidant and antimicrobial activities of *Passiflora* spp. Extracts *Eur. Food Res. Technol.* 223: 102–109.

Berdahl, D. R.; Nahas, R. I.; Barren, J. P. 2010. *Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications*; Elsevier.

Beristain, C., García, H. & Vernon, E. (2001). Spray-dried encapsulation of cardamom (*Elettaria cardamomum*) essential oil with mesquite (*Prosopis juliflora*) gum. *Food Science and Technology*. 34, 398-401.

Botsoglou N., Taitzoglou I., Botsoglou E., Zervos I., Kokoli A. Christaki E., Nikolaidis E. 2009. Effect of long-term dietary administration of oregano and rosemary on the antioxidant status of rat serum, liver, kidney and heart after carbon tetrachloride-induced oxidative stress. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(8), 1397.

Boudet, A.-M. 2007. Evolution and status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*. 68, 2722–35.

Branchi, B., Galli, C. and Gentili, P., 2005. Kinetics of oxidation of benzyl alcohols by the cation and radical cation of ABTS. Comparison with laccase-ABTS oxidations: an apparent paradox, *Org. Biomol. Chem.* 3, 2604-2614.

Cardoso-Ugarte, GA, López-Malo, A, Palou, E, Ramírez-Corona, N, Jiménez-Fernández, M, Jiménez-Munguía, MT. 2021. Stability of oregano essential oil encapsulated in double (w/o/w) emulsions prepared with mechanical or high-pressure homogenization and its effect in *Aspergillus niger* inhibition. *J Food Process Preserv.* 45:e15104. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15104>

Carvajal Carvajal, Carlos. 2019. Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1), 91-100.

Carrasco, A., Perez, E., Cutillas, A.-B., Martinez-Gutierrez, R., Tomas, V., & Tudela, J. 2016. Origanum Vulgare and Thymbra Capitata Essential Oils from Spain. Determination of Aromatic Profile and Bioactivities *Natural Product Communications* <https://doi.org/10.1177/1934578X1601100133>.

Chaquilla G., Torres V., Ballinas M. 2008, Actividad antioxidante del aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia berlandieri* Schauer) en sistemas alimenticios. *Revista de Salud Pública y Nutrición RESPYN U.A.N.L* No.1 Edición Especial. Trabajo No. 14.

Cortés Camargo Stefani, Cruz-Olivares Julian, Barragan Blanca, Dublan Octavio, Roman Guerrero Angelica, Pérez-Alonso, César. 2017. Microencapsulation by spray drying of lemon essential oil: Evaluation of mixtures of mesquite gum – nopal mucilage as new wall materials. *Journal of Microencapsulation*. 34. 10.1080/02652048.2017.1338772.



Cueto M., 2010. Determinación del efecto inhibitorio del aceite esencial y diferentes extractos de orégano (*Lippia Berlandieri Schauer*) sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum* tanto *in vitro* como en plántula de tomate. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas U.A.N.L. p. 60-67 .

Da Costa JM, Borges SV, Hijo AA, Silva EK, Marques GR, Cirillo MÂ, de Azevedo VM. 2013. Matrix structure selection in the microparticles of essential oil oregano produced by spray dryer. J Microencapsul. 2013;30(8):717-27. doi: 10.3109/02652048.2013.778909.

Da Porto, Carla & Calligaris, Sonia & Celotti, Emilio & Nicoli, Maria. 2000. Antiradical Properties of Commercial Cognacs Assessed by the DPPH • Test. Journal of agricultural and food chemistry. 48. 4241-5. 10.1021/jf000167b.

Darvesh, A.S., Carroll, R.T., Bishayee, A., Geldenhuys, W.J., Van der Schyf, C.J., 2010. Oxidative stress and Alzheimer's disease: dietary polyphenols as potential therapeutic agents. Expert Review of Neurotherapeutics. 10(5):729-745.

Dasuri, K., Zhang, L., Keller, J.N., 2013. Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. Free Radical Biology and Medicine.62:170-185.

Dávalos, Alberto, Carmen Gómez-Cordovés, and Begoña Bartolomé. 2004 “Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay.” Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(1): 48–54.

Demuner, A. J., Barbosa, L. C. A., Magalhaes, C. G., Da Silva, C. J., Maltha, C. R. A., & Pinheiro, A. L. 2011. Seasonal variation in the chemical composition and antimicrobial activity of volatile oils of three species of leptospermum (*Myrtaceae*) grown in Brazil. *Molecules*, 16(2), 1181–1191. <http://doi.org/10.3390/molecules16021181>.

Erlar F. y H. Cetin, 2009. Components from the Essential Oils from Two *Origanum* Species as Larvicides Against *Euproctis chrysorrhoea* (Lepidoptera: *Lymantriidae*). *Journal of Agricultural and Urban Entomology*. Vol. 26: 31-40.

Espinosa-Andrews, H., Báez-González, J. G., Cruz-Sosa, F., & Vernon-Carter, E. J. 2007. Gum Arabic–Chitosan Complex Coacervation. *Biomacromolecules*, 8(4), 1313-1318. doi:10.1021/bm0611634.

Esquivel A., Vargas P., 2007. Uso de aceites esenciales extraídos por medio de fluidos supercríticos para la elaboración de alimentos funcionales. *Revista Tecnología en Marcha*. Vol. 20-4 - Octubre – Diciembre p. 41-50.

Fabela Moron, M.F., 2017. Tecnologías de nano/microencapsulación de compuestos bioactivos, Primera Edición, CIATEJ. Guadalajara Jalisco, México. Cap. 14 ISBN: 978-607-97548-3-9

Fernandes RV, Borges SV, Botrel DA. 2014. Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. *Carbohydr Polym*. Jan 30;101:524-32.

Flores Tique, Y. 2017. Evaluación del efecto antimicrobiano del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) aplicado en el pan molde en microencapsulado y pulverizado. Tesis Licenciatura. Universidad Peruana.

Freire Rodríguez María J. 2017. “Desarrollo de emulsiones dobles y emulsiones dobles gelificadas como análogos de grasa y su aplicación en productos cárnicos funcionales”, Tesis Doctoral, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC), España.

Gallego Iradi Maria Gabriela. 2016. Estudio de la actividad antioxidante de diversas plantas aromáticas y/o comestibles. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de Catalunya (UPC), España.

García N. 2012. Aprovechamiento de orégano silvestre (*Lippia spp.*), en la comunidad de Tesila, el Fuerte, Sinaloa. Tesis de Maestría. Institución Intercultural del Estado de Sinaloa. Universidad Autónoma Indígena de México.

Gómez, F.; Sánchez, S.; Iradi, M.; Azman, N.; Almajano, M. 2014. Avocado Seeds: Extraction Optimization and Possible Use as Antioxidant in Food. *Antioxidants*. 3, 439–454.

Granados C, Yáñez X, Acevedo D. 2014. Evaluación de la Actividad Antioxidante del Aceite Esencial Foliar de *Myrcianthes leucoxylla* de Norte de Santander (Colombia). *Inf tecnológica*; 25(3):11-16.

Guzmán Morales Ana Paola. 2009. Actividad antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial y extractos (crudo, acuoso, y etanólico) de Pipicha (*Porophyllum tagetoides*). Tesis Maestría. Universidad Veracruzana. Mexico.

Halliwel, B., 2012. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition Reviews*. 70(5):257-265.

Haytowitz, D.B., Bhagwat, S.A. USDA database for the oxygen radical capacity (ORAC) of selected foods. 2010. release 2. USDA National Nutrient Database for Standard Reference. Available: <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata>

Herrera-Rodríguez SE, López-Rivera RJ, García-Márquez E, Estarrón-Espinosa M, Espinosa-Andrews H. 2018. Mexican oregano (*Lippia graveolens*) essential oil-in-water emulsions: impact of emulsifier type on the antifungal activity of *Candida albicans*. *Food Sci Biotechnol*. Oct 25;28(2):441-448. doi: 10.1007/s10068-018-0499-6. PMID: 30956856; PMCID: PMC6431336.

Hernández E., Ponce E., Jaramillo M., Legarreta I., 2009, Efecto antioxidante de los extractos de romero (*Rosmarinus officinalis L.*), de salvia de bolita (*Buddleia perfoliata* Kunth) y de orégano mexicano (*Lippia spp*) en pastas cárnicas. *Revista de Salud Pública y Nutrición* No.1 Edición Especial. *Meat Science* 81: 410-417.

Huang, D.; Ou, B.; Prior, R.L. 2005. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.* 53: 1841-1856.

Huang, Q., Yu, H., & Ru, Q. 2010. Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. *Journal of Food Science*, 75(1), R50-R57.

Huerta, C. 1997. Orégano mexicano: oro vegetal. *Biodiversitas* 15: 8-13 p.

Hugo Espinosa Andrews y Eristeo García Márquez. 2017. *Tecnologías De Nano/Microencapsulación De Compuestos Bioactivos*. CIATEJ.

Jiménez-Alvarado, R., Beristain, C. I., Medina-Torres, L., Roman-Guerrero, A. and Vernon-Carter, E. J. 2009. "Ferrous bisglycinate content and release in W(1)/O/W(2) multiple emulsions stabilized by protein polysaccharide complexes." *Food Hydrocolloids* 23(8): 2425-2433.

Justasen U, Knuthsen P. 2001. Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. *Food Chemistry*.

Kelble A. 2005. Spices and type 2 diabetes. *Nutrition and Food Science*; 2005; 35, 2; pg.81-90.

Klinkesorn U., McClements D.J. 2009. Influence of chitosan on stability and lipase digestibility of lecithin-stabilized tuna oil-in-water emulsions. *J Food Chemistry* 114 (2009) 1308–1315.

Kosakowska O, Węglarz Z, Pióro-Jabrucka E, Przybył JL, Kraśniewska K, Gniewosz M, Bączek K. 2021. Antioxidant and Antibacterial Activity of Essential Oils and Hydroethanolic Extracts of Greek Oregano (*O. vulgare* L. subsp. *hirtum* (Link) Ietswaart) and Common Oregano (*O. vulgare* L. subsp. *vulgare*). *Molecules*. Feb 13;26(4):988. doi: 10.3390/molecules26040988. PMID: 33668450; PMCID: PMC7918425.

Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Cien. Tecnol. Aliment.* 25 (4), p.p. 726- 732.

Leyva, L. N., Gutiérrez, G. E., Vázquez O. G., & Heredia, J. B. 2017. Essential oils of oregano: Biological activity beyond their antimicrobial properties. *Molecules*, 22(6). <http://doi.org/10.3390/molecules22060989>

López M. B., Carvajal L., Millan, L. 2009. Establecimiento de condiciones de la mezcla de pulpa de banano (*musa paradisiaca l.*) para someter a secado por aspersion. *Revista de la facultad de química farmacéutica* ISSN 0121-4004, ISSNe 2145-2660. Volumen 16 número 3, año 2009. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. págs. 287-296.2

Macías-Cortés, E., Gallegos-Infante, J., Rocha-Guzmán, N., Moreno-Jiménez, M., Medina-Torres, L., & González-Laredo, R. 2019. Microencapsulation of phenolic compounds: technologies and novel polymers. *Revista Mexicana De Ingeniería Química*, 19(2), 491-521. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Alim642>

Maestri DM, Nepote V, Lamarque AL, Zygodlo JA. 2006. Natural products as antioxidants. *Phytochemistry. Advances in Research.* 105-35.

Makahleh, A., Saad, B., & Bari, M. F. 2015. *Handbook of Antioxidants for Food Preservation.*

Manach, C.; Mazur, A.; Scalbert, A. 2005. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Curr. Opin. Lipidol.* 16, 77–84.

McClements, D. J. 2004. *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques*, Second Edition: Taylor & Francis.

McClements, D. J. 2006. "Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides." *Biotechnology Advances* 24(6): 621-625.

McClements, D. J. 2010. Emulsion design to improve the delivery of functional lipophilic components. *Annual review of food science and technology*, 1, 241-269.

McClements, D. J. 2014. *Nanoparticle-and microparticle-based delivery systems: Encapsulation, protection and release of active compounds*: CRC Press.

McClements, D. J., Decker, E., & Weiss, J. 2007. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *Journal of Food Science*, 72(8).

McClements, D. J., E. A. Decker and J. Weiss .2007. "Emulsion-Based Delivery Systems for Lipophilic Bioactive Components." *Journal of Food Science* 72(8): R109-R124.

Mimica-Dukic N, Bugarin D, Grbovic S,. 2010. Essential oil of *Myrtus communis* L. As a potential antioxidant and antimutagenic agents. *Molecules*;15(4):2759-2770.

Miron T., Gazi I. Plaza del Moral. 2010. Romanian Aromatic Plants as Source of Antioxidants. *J. Innovative Romanian Food Biotechnology Vol. 6, pg 18 -26*

Moon, J.K.; Shibamoto, T. 2009. Antioxidant assays for plant and food components. *J. Agric. Food Chem.* 57: 1655-1666.

Muñoz A., Castañeda M., 2007. Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol. *Scientia Et technica* Vol XIII, Número 033, p. 125-128

Navarro-González, Inmaculada, Periago, María Jesús, García-Alonso, Francisco Javier. 2017. Estimación de la capacidad antioxidante de los alimentos ingeridos por la población española. *Revista Chilena de Nutrición*; 44(2):183-188.

Nenadis, N., Wang, L-F., Tsimidou, M., And Zhang, H-Y., 2004. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS.+ Assay, *J. Agric. Food Chem.* 52, 4669-4674.

Olimpia S., Godinez L., y Peralta J. 2005. Caracterización de la actividad antioxidante de películas biodegradables, *Revista conciencia tecnológica* número 027-30, Instituto Tecnológico de Aguascalientes.

Olivas N.A., Bejarano C.V., Soto G.A., Ortega M.Z., Salas F.S., Chávez E.S., Hernández Ochoa L. 2020. Bioactive compounds and antioxidant activity of essential oils of *Origanum dictamnus* from Mexico[J]. *AIMS Agriculture and Food*, 5(3): 387-394. doi: 10.3934/agrfood.2020.3.387

Olmedo R.H.; Nepote V.; Mestrallet M.G. y Grosso N.R. 2009. Aceite esencial de orégano como antioxidante natural para aceite de maní XXIV Jornada Nacional de Maní. *Química Biológica*, Facultad de Ciencias Agropecuarias (UNC) – IMBIV-CONICET, p. 53-54

Ortega N, M., Robles B, M., Acedo F, E., González L, A., y Vázquez M, L. 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of oregano essential oil (*Lippia palmeri* S. WATS ), *Revista Fitotecnia Mexicana*, vol. 34, núm. 1, enero-marzo, 2011, pp. 11-17 *Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C. Chapingo*, 34(1), 11–17.

Ozkan, G., Baydar, H., Erbas, S. 2010. The influence of harvest time on essential oil composition, phenolic constituents and antioxidant properties of Turkish oregano (*Origanum onites L.*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(2), 205.

Paredes Aguilar, María de la Cruz, Gastélum Franco, María Guadalupe, Silva Vázquez, Ramón, Nevárez-Moorillón, Guadalupe Virginia. 2007. "Efecto antimicrobiano del orégano mexicano (*lippia berlandieri* Schauer) y de su aceite esencial sobre cinco especies del género *vibrio*." *Revista Fitotecnia Mexicana*, vol. 30, no. 3, pp.261-267. Redalyc, <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61003008>

Parra Huertas, A., 2010 Revisión: Microencapsulación de Alimentos. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Facultad de Ciencias Básicas. Avenida Central del Norte. Tunja, Colombia. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín* 63(2):5669-5684.

Peredo L, H, Palou G, E., López M, A., 2009. Aceites esenciales: métodos de extracción. *TSIA (Temas Selectos de Ingenieria de alimentos) UDLAP*. 3-1: 24-32

Pérez-Orozco, J.P., Barrios-Salgado, E., Róman-Guerrero, A., & Pedroza-Islas, R. (2011). Interacción goma de mezquite-quitosano en la interfase y su influencia en la estabilidad de emulsiones múltiples W1/O/W2. *Revista mexicana de ingeniería química*, 10(3), 487-499.

Phaniendra, A., Jestadi, D.B., 2015. Free radical: properties, sources, targets, and their implication in various diseases, *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 30(1):11-26.

Piorkowski, D. T., & McClements, D. J. 2014. Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications. *Food Hydrocolloids*, 42, 5-41.

Pisoschi, A.M., Pop, A., 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*.97:55-74.

Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M., 2005, *Antioxidantes de los Alimentos Aplicaciones Prácticas*. Editorial Acribia. Zaragoza, España. pp. 23-60, 265-280



Pokorny, J. 2007. Are natural antioxidants better – and safer – than synthetic antioxidants? *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109, 629–642.

Porras Loaiza A.P., López Malo A., 2009. Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Temas Selectos de Ingenieria de Alimentos* 3-1, pp 121-134.

Preedy, V. R., 2015, *Essential oils in food preservation, flavor and safety*. Elsevier, London UK, pag 31-30 ISBN 9780124166417

Prior, R.L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B., Jacob, R. 2003. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other bio-logical and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, pp. 3273–3279.

Ramos F, G. 2009. Estabilidad de microcapsulas de aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens* Kunth). Tesis Maestria. Universidad Veracruzana. Mexico.

Ramírez-Nieto, Natalia, Baena, Yolima, & Osorio, Coralia. 2019. Caracterización Fisicoquímica de Emulsiones Aceite/Agua a partir de Uchuva (*Physalis peruviana*) como Ingrediente para la Industria Alimenticia. *Información tecnológica*, 30(3), 147-156. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642019000300147>

Re, R., Pellegrini, A., Proteggente, A., Pannala, A. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.* 26, 1231-1237.

Reyes R. 2008. Efecto de los polifenoles y de la fibra dietética del frijol sobre los niveles de los lípidos séricos. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Biológicas U.A.N.L. p. 20-30, 45

Rivero, C., Duarte G., Navarrete A., Bye R., Linares E., y Mata R. 2011. Chemical Composition and Antimicrobial and Spasmolytic Properties of *Poliomintha longiflora* and *Lippia graveolens* Essential Oils. *Journal of Food Science* Vol. 76: 2 309-317 p.

Rodríguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M.C., Zabalza, A., Corpas, F.J., Gómez, M., Del Río, L.A. And Sandalio, L.M. 2006. Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation in vivo. *Plant, Cell & Environment*, 29: 1532-1544.

Schauss, A.G.; Wu, X.; Prior, R.L.; Ou, B.; Huang, D.; Owens, J.; Agarwal, A.; Jensen, G.S.; Hart, A.N.; Shanbrom, E. 2006. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze dried amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Acai). *J. Agric. Food Chem.* 54: 8604-8610.

Seppanen, C. M.; Song, Q.; Saari Csallany, A. 2010. The Antioxidant Functions of Tocopherol and Tocotrienol Homologues in Oils, Fats, and Food Systems. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 87, 469–481.

Shah P., Modi H. A., 2015, Comparative study of DPPH, ABTS and FRAP assays for determination of antioxidant activity. *International Journal for Research in Applied Science & Engineering Technology*. Vol 3, ISSN 2321-9653, P. 636-641.

Sibaja Hernández Roberto 2015. Propiedades Fisicoquímicas y Funcionales de las gomas de *Acaciacoehliacantha* y *Acacia farnesiana*. Tesis Doctoral, Instituto Politécnico Nacional-Centro De Desarrollo De Productos Bióticos. Mexico.

Silva-Vazquez R, Duran-Melendez LA, Mendez-Zamora G, Estrada ES, Xie M. 2017. Antioxidant Activity of Essential Oils from Various Mexican Oregano Ecotypes and Oil Fractions Obtained by Distillation. *JSM Chem*, 5(3): 1046.

Singletary, K. 2010. Oregano: Overview of the Literature on Health Benefits. *Nutrition Today*, 45(3), 129.

Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*; 299: 152-179.

Stashenko E., Ruíz C.A., Arias G., Durán D.C., Salgar W., Cala M., Martínez M.R. 2010. *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS analysis and PCA. *J. Sep. Sci*; 33: 93-103

Tadros, T. F. 2009. *Emulsion science and technology: a general introduction*: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Torrenegra Alarcon. M. E. 2014. Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar extraído de especies de orégano (*Origanum Vulgare*), orégano “borde blanco” (*Origanum Vulgare Ssp*) y oreganito (*Lippia Alba Mill*) cultivado en la zona norte del departamento de bolívar (Colombia). Tesis de Maestría. Universidad De Cartagena.

Traesel C.K., Wolkmer P., Schmidt C., Silva C., Paim F., Rosa A., Alves S., Santurio T., Lopes S. 2010. Serum biochemical profile and performance of broiler chickens fed diets containing essential oils and pepper. Springer-Verlag London Limited, *Comp Clin Pathol*, pg 10- 18.

Tuttolomondo Teresa, Leto Claudio, Leone Raffaele, Licata Mario, Giuseppe Virga, Giuseppe Ruberto, Edoardo M. Napoli, Salvatore La Bella. 2014. Essential oil characteristics of wild Sicilian oregano populations in relation to environmental conditions, *Journal of Essential Oil Research*, 26:3, 210-220, DOI: 10.1080/10412905.2014.882278

Velasquez M., Gomez B., & Contreras R. 2004. El envejecimiento y los radicales libres. *Ciencias* 75: 36–43.

Vernon-Carter EJ, Nieto-Villalobos Z, Velásquez Madrazo O, Valle-Vega P, de Aluja AS, Constantino F, Zamora C, Pedroza-Islas R, Janczur M, Bourges-Rodríguez H, Espinosa J, de la Fuente Dorado L (1996) Evaluation of mesquite gum toxicity. Multidisciplinary committee report submitted to the Mexican Welfare Secretariat.

Viada Pupo, Esther, Gómez Robles, Lisvelt, & Campaña Marrero, Ibel Reyna. 2017. Estrés oxidativo. *Correo Científico Médico*, 21(1), 171-186.

Villavicencio G., E.E., A.C. Pineda, X. García C. 2010. Metodología para determinar las existencias de orégano (*Lippia graveolens* H.B.K.) en rodales naturales de Parras de la Fuente, Coahuila. Folleto Técnico No. 42. CIRNE-INIFAP, Campo Experimental Saltillo.

Walczak, M.; Michalska-Sionkowska, M.; Olkiewicz, D.; Tarnawska, P.; Warzyńska, O. 2021. Potential of Carvacrol and Thymol in Reducing Biofilm Formation on Technical Surfaces. *Molecules*, 26, 2723. <https://doi.org/10.3390/molecules26092723>

Watson, R. R., Preedy, V. R., & Zibadi, S. 2013. Polyphenols in human health and disease (pp. 37-38): Academic Press.

Wojtunik-Kulesza, K.A., Oniszczyk, A., Oniszczyk, T., Waksmundzka-Hajnos, M., 2016. The influence of common free radicals and antioxidants on development of Alzheimer's disease. *Biomedicine and Pharmacotherapy*.78:39- 49.

Zheng W. y Wang S.Y. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, p. 5165-5170

## RESUMEN BIOGRAFICO

Alma Elisa Mora Zúñiga

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Orientación en Alimentos

Tesis: OBTENCIÓN DE UN PRODUCTO ANTIOXIDANTE DE ACEITE  
ESENCIAL DE ORÉGANO *Poliomintha longiflora* Gray PARA SU  
APLICACIÓN A TRAVÉS DE EMULSIONES

Campo de Estudio: Ciencias Biológicas

Datos Personales: Nació en Monterrey, Nuevo León el 6 de Julio de 1979, hija de Héctor  
Ismael Mora Castillo y Delfina Zúñiga Medina.

Educación: Egresada de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma  
de Nuevo León, grado obtenido Licenciado en Ciencias de Alimentos en 2001

Experiencia Profesional: Maestro de Asignatura de la Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad Autónoma de Nuevo León desde 2011 hasta 2021.