

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIFÚNGICA DEL
ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO SILVESTRE (*Lippia origanoides* Kunth)
DEL ALTO PATÍA**

**DIANA PANTOJA DAZA
LORENA SANTACRUZ CHAZATAR.**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL
SAN JUAN DE PASTO
2011**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIFÚNGICA DEL
ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO SILVESTRE (*Lippia origanoides* Kunth)
DEL ALTO PATÍA**

**DIANA PANTOJA DAZA
LORENA SANTACRUZ CHAZATAR.**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Ingeniero Agroindustrial.**

**Director: Ing. Oscar Arango Bedoya. Msc.
Codirector: Dr. Andrés Hurtado Benavides.**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL
SAN JUAN DE PASTO
2011**

NOTA DE ACEPTACION

Dr. Andrés Hurtado Benavides.

Dr. Claudia Salazar Gonzalez.

Dr. Oswaldo Osorio Mora.

San Juan de Pasto, 10 de Diciembre de 2010.

Dedicatoria

A Dios, por darme las fuerzas necesarias para luchar día tras día, por llenar mi vida siempre de mil bendiciones y guiar mi camino, a la vírgencita por ser mi compañera incondicional.

A mis papitos, Campo y Cristina no tengo palabras para agradecerles todo lo que han hecho por mí, al igual que a mi hermana Diana que es mi ejemplo a seguir iii LOS AMO!!!!

Al resto de mi familia que siempre me han apoyado y confiado en mí.

A Diana agradecerle por todos los momentos que hemos pasado juntas y nos han hecho consolidar una amistad que espero que dure para siempre.

Lorena Santacruz Chazatar

Al Señor Creador del cielo y de la tierra, a Jesucristo mi Salvador y al Espíritu Santo mi Consolador, que son uno y me han permitido ser uno con ellos: Gracias, muchas gracias por la obra que haces en mi vida, por ser mi Padre, mi maestro, mi hermano; te amo profundamente y quiero amarte más como Tú lo mereces. Señor, Dios mío, en ti he confiado, por tu gracia he llegado hasta aquí y contigo han serán todos mis días como lo han sido hasta hoy. ¡Cuan hermoso eres Señor!

Gracias Señor, por todas las personas que has puesto para mi bendición como muestra de tu amor; por mis padres, Carlos y Fabiola, Jaime mi mejor amigo, mi compañera y amiga Lorena, y la gran familia en Cristo que me has entregado; pido que los guardes, protejas y bendigas sus vidas en abundancia.

Al único y sabio Dios, sea gloria
mediante Jesucristo para siempre.
Amén. Rom. 16.27.

Diana Pantoja Daza.

AGRADECIMIENTOS

De manera muy sincera queremos expresar nuestros agradecimientos al profesor Oscar Arango por su dedicación y apoyo en la dirección de esta investigación.

Al profesor Andrés Hurtado por su oportuna colaboración.

A nuestros jurados Oswaldo Osorio y Claudia Salazar por sus recomendaciones y opiniones en el desarrollo del trabajo.

Al grupo de investigación Tecnología Emergentes en Agroindustria (TEA) por darnos la oportunidad de realizar esta investigación.

Al personal de los laboratorios y planta pilotó de la Universidad de Nariño, por su ayuda, apoyo, y consejos. Un especial agradecimiento a Alexander Pantoja por su incondicional ayuda.

TABLA DE CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	19
1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA	21
2. JUSTIFICACIÓN	23
3. OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVO GENERAL	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	26
4.1 El orégano	26
4.1.1 Características Generales	26
4.1.2 Taxonomía de <i>Lippia origanoides</i> Kunth	26
4.1.3 Producción Nacional e Internacional de orégano	26
4.1.4 Composición y usos potenciales	27
4.2 Métodos de determinación de la actividad antioxidante	29
4.2.1 Métodos de captura de radicales	29
4.3 La actividad antioxidante en aceites esenciales	31
4.4 Métodos de determinación de la actividad antifúngica	34
4.5 La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales	35
4.6 Fitopatógeno <i>Phytophthora infestans</i>	37
4.6.1 Taxonomía y clasificación de <i>Phytophthora infestans</i>	37
5. DISEÑO METODOLÓGICO	40
5.1 Material vegetal	40

5.2	Proceso de extracción	41
5.3	Evaluación de la actividad antioxidante	41
5.3.1	Ensayo de DPPH•	41
5.3.2	Ensayo del ABTS•+	43
5.4	Evaluación actividad antimicrobiana	44
5.4.1	Obtención del patógeno	44
5.4.2	Preparación del medio de cultivo	44
5.4.3	Inoculación en el medio de cultivo	45
5.4.4	Incubación del microorganismo	45
5.5	Diseño experimental	45
5.6	Análisis estadístico	47
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
6.1	Extracción del Aceite	48
6.1.1	Análisis cromatográfico	48
6.2	Evaluación de la actividad antioxidante	52
6.2.1	Ensayo DPPH•	52
6.2.1.1	Ensayo DPPH• con aceite esencial de orégano <i>Lippia origanoides</i> Kunth	52
6.2.1.2	Evaluación de la capacidad de captura radical DPPH• de los antioxidantes convencionales ácido ascórbico, BHT y BHA y comparación con la del aceite esencial <i>Lippia origanoides</i> Kunth	62
6.2.1.2.1	Ensayo de DPPH• con ácido ascórbico	62
6.2.1.2.2	Ensayo de DPPH• con BHT	65
6.2.1.2.3	Ensayo de DPPH• con BHA	68
6.2.2	Ensayo ABTS•+	75
6.2.2.1	Ensayo de ABTS•+ con aceite esencial de orégano <i>Lippia origanoides</i> Kunth	77
6.2.2.2	Evaluación de la capacidad de captura radical ABTS•+ de los antioxidantes convencionales ácido ascórbico, BHT y BHA y comparación con la del aceite esencial <i>Lippia origanoides</i> Kunth	84
6.2.2.2.1	Ensayo de ABTS•+ con ácido ascórbico	84
6.2.2.2.2	Ensayo de ABTS•+ con BHT	88
6.2.2.2.3	Ensayo de ABTS•+ con BHA	91
6.3	Evaluación de la capacidad antimicrobiana del aceite de orégano	99

7. CONCLUSIONES	106
8. RECOMENDACIONES	107
BIBLIOGRAFÍA	108
ANEXOS	118

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1 Tratamientos evaluados para la determinación de actividad antifúngica	46
Cuadro 2 Escala de sensibilidad propuesta por Shattock	47
Cuadro 3 Condiciones de extracción del aceite esencial de orégano y rendimiento obtenido	48
Cuadro 4 Composición del aceite esencial de orégano (<i>Lippia origanoides</i> Kunth) extraído por arrastre con vapor	49
Cuadro 5 Valores de absorbancia para diferentes concentraciones de DPPH•	53
Cuadro 6 Porcentaje de DPPH• remanente a diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano	55
Cuadro 7 Porcentaje de inhibición a diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano en el tiempo estacionario	58
Cuadro 8 Segunda prueba porcentaje de DPPH• remanente a diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano	60
Cuadro 9 Segunda prueba porcentaje de Inhibición a diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano en el tiempo estacionario	61
Cuadro 10 Porcentaje de DPPH• remanente a diferentes concentraciones de ácido ascórbico	63
Cuadro 11 Porcentaje de inhibición a diferentes concentraciones de ácido ascórbico en el tiempo estacionario	64
Cuadro 12 Porcentaje de DPPH• remanente a diferentes concentraciones de BHT	66
Cuadro 13 Porcentaje de Inhibición para diferentes concentraciones de BHT	67

Cuadro 14 Porcentaje de DPPH• remanente a diferentes concentraciones BHA	68
Cuadro 15 Porcentaje de Inhibición a diferentes concentraciones de BHA	70
Cuadro 16 Comparación de la actividad antioxidante del aceite de orégano frente al ácido ascórbico, BHT y BHA	70
Cuadro 17 Comparación de la actividad antioxidante del aceite esencial de orégano frente a otros antioxidantes convencionales	72
Cuadro 18 Resultados de la prueba ABTS•+ con patrones de Trolox	76
Cuadro 19 Prueba de ABTS•+ para el aceite de orégano (minuto 1 de reacción)	77
Cuadro 20 Porcentaje de inhibición de ABTS•+ con aceite de orégano (minuto 1 de reacción)	78
Cuadro 21 Prueba de ABTS•+ para el aceite de orégano (minuto 7 de reacción).	79
Cuadro 22 Porcentaje de inhibición del radical ABTS•+ con diferentes concentraciones de aceite de orégano (minuto 7 de la reacción)	80
Cuadro 23 Segunda prueba de ABTS•+ para el aceite de orégano (minuto 1 de reacción)	81
Cuadro 24 Segunda prueba porcentaje de inhibición de ABTS•+ con aceite de orégano (minuto 1de reacción)	82
Cuadro 25 Segunda prueba de ABTS•+ para el aceite de orégano (minuto 7 de reacción)	83
Cuadro 26 Porcentaje de inhibición de ABTS•+ con aceite de orégano (minuto 7 de reacción)	83
Cuadro 27 Ensayo de ABTS•+ con ácido ascórbico (minuto 1de reacción)	85
Cuadro 28 Porcentaje de inhibición de ABTS•+ con ácido ascórbico (minuto 1 de reacción)	85
Cuadro 29 Ensayo de ABTS•+ con ácido ascórbico (minuto 7 de reacción)	86

Cuadro 30 Porcentaje de inhibición de ABTS•+ con ácido ascórbico (minuto 7 de reacción)	87
Cuadro 31 Comparación de resultados TEAC	88
Cuadro 32 Ensayo de ABTS•+ con BHT (minuto 1 de reacción)	88
Cuadro 33 Porcentaje de inhibición de ABTS•+ con BHT (minuto 1 de reacción)	89
Cuadro 34 Ensayo de ABTS•+ con BHT (minuto 7 de reacción)	90
Cuadro 35 Porcentaje de inhibición de ABTS•+ con BHT (minuto 7 de reacción)	91
Cuadro 36 Ensayo de ABTS•+ con BHA (minuto 1 de reacción)	91
Cuadro 37 Porcentaje de inhibición de ABTS•+ con BHA (minuto 1 de reacción)	92
Cuadro 38 Ensayo de ABTS•+ con BHA (minuto 7 de reacción)	93
Cuadro 39 Porcentaje de inhibición de ABTS•+ con BHA (minuto 7 de reacción)	94
Cuadro 40 Resumen de resultados del ensayo de ABTS•+ (minuto 7 de reacción)	94
Cuadro 41 Ensayos de emulsificación del aceite de orégano con Tween 20	99
Cuadro 42 Concentración de aceite y cantidad de Tween 20 utilizados en el ensayo 1	100
Cuadro 43 Resultados de crecimiento de <i>P. infestans</i> obtenidos en el ensayo 1	100
Cuadro 44 Concentración de aceite y cantidad de Tween 20 utilizados en el ensayo 2	102

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1 Estructura química de los principales componentes del orégano	28
Figura 2 Reacción de reducción de DPPH•, (Radical α,α -difeníl- β -picrilhidracilo)	30
Figura 3 Equipo de extracción por arrastre con vapor a nivel de planta piloto	41
Figura 4 Ecuación molecular de DPPH•	41
Figura 5 Ecuación molecular del ABTS•+	43
Figura 6 Perfil cromatográfico del aceite esencial de orégano	49
Figura 7 Fórmula estructural de timol	52
Figura 8 Recta de calibración de DPPH•	53
Figura 9 Porcentaje de DPPH• remanente respecto al tiempo para diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano	54
Figura 10 Porcentaje de DPPH• remanente en función de las concentraciones de aceite de orégano evaluadas	55
Figura 11 Cambio colorimétrico del DPPH•, a diferentes concentraciones de aceite de orégano	56
Figura 12 Porcentaje de inhibición con relación al tiempo para diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano	57
Figura 13 Porcentaje de inhibición de radicales DPPH• con relación a la concentración de aceite esencial de orégano	58
Figura 14 Segunda prueba porcentaje de DPPH• remanente respecto al tiempo para diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano	59

Figura 15 Segunda prueba porcentaje de DPPH• remanente con relación a la concentración de aceite esencial de orégano	60
Figura 16 Segunda prueba porcentaje de inhibición frente al tiempo para diferentes concentraciones de aceite de orégano	61
Figura 17 Segunda prueba porcentaje de inhibición respecto a la concentración de aceite esencial de orégano	61
Figura 18 Porcentaje de DPPH• remanente frente al tiempo para diferentes concentraciones de ácido ascórbico (mg/mL)	62
Figura 19 Porcentaje de DPPH• remanente frente a las concentraciones de ácido ascórbico evaluadas (mg/mL)	63
Figura 20 Porcentaje de inhibición frente al tiempo para diferentes concentraciones de ácido ascórbico (mg/mL)	64
Figura 21 Porcentaje de inhibición para las concentraciones de ácido ascórbico evaluadas (mg/mL)	65
Figura 22 Porcentaje de DPPH• remanente respecto al tiempo para diferentes concentraciones de BHT (mg/mL)	65
Figura 23 Porcentaje de DPPH• remanente frente a las concentraciones de BHT evaluadas (mg/mL)	66
Figura 24 Porcentaje de inhibición frente al tiempo para diferentes concentraciones de BHT (mg/mL)	67
Figura 25 Porcentaje de inhibición para diferentes concentraciones de BHT (mg/mL)	68
Figura 26 Porcentaje de DPPH• remanente respecto al tiempo para diferentes concentraciones de BHA (mg/mL)	68
Figura 27 Porcentaje de DPPH• remanente con relación a las concentraciones de BHA evaluadas (mg/mL)	69
Figura 28 Porcentaje de inhibición respecto a la concentración de BHA (mg/mL)	69.

Figura 29 Comparación de la actividad antioxidante del aceite esencial de orégano frente a otros antioxidantes convencionales (efecto de 5 ppm)	70
Figura 30 Comparación de la actividad antioxidante del aceite esencial de orégano frente a otros antioxidantes convencionales medida en porcentaje de inhibición	73
Figura 31 Comparación de la actividad antioxidante del aceite esencial de orégano frente a otros antioxidantes convencionales medida en porcentaje de inhibición	74
Figura 32 Comparación de la actividad antioxidante del aceite esencial de orégano frente a otros antioxidantes convencionales medida en porcentaje de inhibición (tiempo 20min)	75
Figura 33 Curva de calibración Trolox	76
Figura 34 Porcentaje de inhibición de ABTS•+ con Trolox	77
Figura 35 Prueba de ABTS•+ para el aceite de orégano (minuto 1 de reacción)	78
Figura 36 Porcentaje de inhibición de ABTS•+ con diferentes concentraciones de aceite de orégano (minuto 1 de reacción)	78
Figura 37 Prueba de ABTS•+ para el aceite de orégano (minuto 7 de reacción)	79
Figura 38 Porcentaje de inhibición del radical ABTS•+ con diferentes concentraciones de aceite de orégano (minuto 7 de la reacción)	80
Figura 39 Segunda prueba de ABTS•+ para el aceite de orégano (minuto 1 de reacción)	81
Figura 40 Segunda prueba porcentaje de inhibición de ABTS•+ con aceite de orégano (minuto 1de reacción)	82
Figura 41 Segunda prueba de ABTS•+ para el aceite de orégano (minuto 7 de reacción)	83

Figura 42 Porcentaje de inhibición de ABTS•+ al minuto 7 con diferentes concentraciones de aceite de orégano	84
Figura 43 Ensayo de ABTS•+ con ácido ascórbico (minuto 1 de reacción)	85
Figura 44 Porcentaje de inhibición de ABTS•+ con ácido ascórbico (minuto 1 de reacción)	86
Figura 45 Ensayo de ABTS•+ con ácido ascórbico (minuto 7 de reacción)	87
Figura 46 Porcentaje de inhibición de ABTS•+ con ácido ascórbico (minuto 7 de reacción)	87
Figura 47 Ensayo de ABTS•+ con BHT (minuto 1 de reacción)	89
Figura 48 Porcentaje de inhibición de ABTS•+ con BHT (minuto 1 de reacción)	89
Figura 49 Ensayo de ABTS•+ con BHT (minuto 7 de reacción)	90
Figura 50 Porcentaje de inhibición de ABTS•+ con BHT (minuto 7 de reacción)	91
Figura 51 Porcentaje de inhibición de ABTS•+ con BHA (minuto 1 de reacción)	92
Figura 52 Porcentaje de inhibición de ABTS•+ con BHA (minuto 1 de reacción)	92
Figura 53 Ensayo de ABTS•+ con BHA (minuto 7 de reacción)	93
Figura 54 Porcentaje de inhibición de ABTS•+ con BHA (minuto 7 de reacción)	94
Figura 55 Resumen de resultados del ensayo de ABTS•+ (minuto 1 de reacción)	95
Figura 56 Resumen de resultados del ensayo de ABTS•+ (minuto 7 de reacción)	95

Figura 57 Valores de TAA para los antioxidantes de estudio (minuto 1 de reacción)	96
Figura 58 Valores de TAA para los antioxidantes de estudio (minuto 7 de reacción)	96
Figura 59 Prueba de Tukey para porcentaje de crecimiento respecto al producto (prueba de Tukey con 95% de nivel de confianza)	100
Figura 60 Cajas Petri sembradas con <i>P. infestans</i> y aceite esencial de orégano	100
Figura 61 Cajas Petri sembradas con <i>P. infestans</i> y Ridomil®	100
Figura 62 Cajas Petri sembradas con <i>P. infestans</i> y Tween 20	100
Figura 63 Porcentaje de inhibición <i>P. infestans</i> respecto al logaritmo natural de la concentración de AEO	102
Figura 64 Porcentaje de crecimiento de <i>P. infestans</i> con relación al logaritmo natural de la concentración de Ridomil®	103

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A Primer ensayo de DPPH• con aceite de orégano	118
Anexo B Segundo ensayo de DPPH• con aceite de orégano	120
Anexo C Ensayo de DPPH• con ácido ascórbico	124
Anexo D Ensayo de DPPH• con BHT	134
Anexo E Ensayo de DPPH• con BHA	136
Anexo F Diseño experimental para datos de porcentaje de crecimiento de <i>P. infestans</i> en cada tratamiento	138

RESUMEN

El aceite esencial de orégano está constituido en su gran mayoría por compuestos fenólicos como el timol, capaz de ser usado como antioxidante y antifúngico en el control de distintos patógenos que atacan innumerables cultivos. Se valoró la actividad antioxidante mediante el ensayo DPPH• y ABTS•+, comparada con antioxidantes convencionales: ácido ascórbico, BHT y BHA. Para el ensayo de DPPH• en valores de EC_{50} (mL SE/mL DPPH•) iniciando por el mejor, resulta: ácido ascórbico $2,15 \cdot 10^{-3}$, BHT 1,328, BHA 0,254 y aceite de orégano 5,583. Sin embargo, dentro de la reacción el efecto que produce una misma concentración de cada antioxidante genera un porcentaje de inhibición que varía el orden de actividad antioxidante así: ácido ascórbico > aceite de orégano > BHT > BHA. Usando el ensayo ABTS•+ se obtienen valores de TEAC (mg Trolox/mL SE) al minuto 7 en el siguiente orden: ácido ascórbico 0,175, aceite de orégano 0,330, BHA 0,476 y BHT 0,679; y el TAA en orden descendente es: ácido ascórbico > BHA > aceite de orégano > BHT. En síntesis, el aceite de orégano muestra una alta actividad antioxidante que supera al BHT y BHA, lo cual se debe a su composición rica en timol (73%) y la acción sinérgica de sus compuestos fenólicos, por tanto, se hace susceptible para emplearse en la conservación de alimentos o en dietas alimentarias de animales. Así mismo se evaluó la actividad antifúngica in vitro de este aceite sobre la “gota o tizón tardío” causado por el patógeno *Phytophthora infestans*, el cual se constituye en el agente fitopatológico más perjudicial de la papa en las zonas húmedas del mundo. La evaluación se realizó empleando el método de dilución en agar tomate, se utilizó un diseño irrestrictamente al azar (DIA) con arreglo factorial con dos factores el factor A correspondió al producto (aceite esencial de orégano y Ridomil®) y el factor B correspondió a las concentraciones (10, 50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Los resultados obtenidos evidencian que al aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides* Kunth) tiene un efecto inhibitorio muy importante contra el fitopatógeno *P. infestans*, ya que desde la dosis mínima probada de 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ se presentó un porcentaje de inhibición de 41,6% en el desarrollo del patógeno y a partir de una concentración de 150 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ se inhibió completamente su crecimiento, por lo cual se considera que es la concentración letal.

Palabras Claves: aceite esencial, *Lippia origanoides* Kunth, Actividad antioxidante, DPPH•, ABTS•+. Actividad antifúngica, *Phytophthora infestans*.

ABSTRACT

The essential oil of oregano is made up mostly of phenolic compounds such as thymol, can be used as an antioxidant and antifungal agents to control many different pathogens that attack crops. Antioxidant activity was assessed by testing DPPH • and ABTS • +, compared with conventional antioxidants: ascorbic acid, BHT and BHA. To test DPPH • in EC50 values (mL / mL DPPH •) starting with the best results: ascorbic acid 2.15×10^{-3} 1.328 BHT, BHA and oregano oil 0.254 5.583. However, within the reaction effect of a same concentration of each antioxidant inhibition generates a percentage that varies the order of antioxidant activity and ascorbic acid > oregano oil > BHT > BHA. Using the ABTS • + assay values obtained TEAC (Trolox mg / mL SE) at minute 7 in the following order: ascorbic acid 0.175, 0.330 oregano oil, BHA, BHT 0.476 and 0.679, and the TAA in descending order are: acid ascorbic acid > BHA > oregano oil > BHT. In short, oregano oil shows high antioxidant activity than BHT and BHA exceeds, which is due to its composition rich in thymol (73%) and the synergistic action of phenolic compounds, therefore, is likely to be used in food storage or animal food diets. Likewise, we evaluated the in vitro antifungal activity of this oil on the "drop or late blight" caused by the pathogen *Phytophthora infestans*, which constitutes the most damaging agent phytopathological potato in the humid areas of the world. The evaluation was done using the agar dilution method tomato, we used an unrestricted random design (DIA) under factorial with two factors corresponded to the product factor A (essential oil of oregano and Ridomil ®) and factor B corresponded to concentrations (10, 50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). The results show that the essential oil of wild oregano (*L. organoides* Kunth) has a very important inhibitor against the plant pathogen *P. infestans*, since from the lowest dose tested of 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ presented a percentage of 41.6% inhibition of pathogen development and from a concentration of 150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ was completely inhibited growth, thus it is considered lethal concentration.

Keywords: essential oil, *Lippia organoides* Kunth, Antioxidant activity, DPPH •, ABTS • +. Antifungal activity, *Phytophthora infestans*.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad se explora el uso y valoración de los productos naturales, donde las plantas juegan un papel importante como fuente de nuevos y variados agentes antimicrobianos, antioxidantes y bactericidas. Existen en el mercado compuestos que son extraídos de partes o la totalidad de la planta por distintos métodos, de los cuales se destacan los aceites esenciales, que contienen compuestos con fracciones líquidas-volátiles que son las sustancias responsables del aroma de las plantas, generalmente son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes. Se han realizado estudios que han demostrado que algunos aceites esenciales poseen ciertas características que los vuelven benéficos para la salud. Los aceites esenciales de plantas aromáticas y medicinales presentan bioactividades notables que atraen la atención de químicos de productos naturales y de importantes sectores de la industria farmacéutica.

Teniendo en cuenta que en el mundo se encuentran una gran variedad de plantas de las cuales se puedan extraer sus aceites, esta investigación se enfoca en el estudio del aceite esencial de *Lippia origanoides* Kunth, el cual crece de forma silvestre en varias zonas de nuestro país, esta especie pertenece a la familia Verbenácea, la cual se caracteriza por la gran variedad de usos que presentan sus especies, algunas de las cuales son de gran aplicación en la farmacéutica, alimentos, textiles y sobre todo, cosmética y perfumería dado su alto contenido de aceites volátiles, de interés industrial.

Una aplicación importante de los aceites esenciales es la relacionada con la actividad antioxidante, algunas investigaciones han confirmado que los alimentos ricos en antioxidantes juegan un papel esencial en la prevención de enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares y cancerígenas causadas por los radicales libres (Gerber *et al.*, 2002; Kris-Etherton *et al.*, 2002; Serafini *et al.*, 2002), males como el de Parkinson y Alzheimer (Di Matteo *et al.*, 2003), así como también inflamaciones y problemas ocasionados por el envejecimiento celular (Ames *et al.*, 1993).

La utilización de antioxidantes es necesaria para prevenir o retardar la oxidación de sustratos susceptibles a ello y servir como preservantes de las características internas de los alimentos, porque retardan el deterioro oxidativo de los aceites y grasas responsables de los olores del enranciamiento y del *off-flavours* (Correa, 2006).

La actividad antioxidante de una sustancia está relacionada directamente con la cantidad de compuestos fenólicos presentes en ella (García *et al.*, 2007), uno de los

compuestos es el timol, el cual constituye el componente mayoritario en el aceite esencial del orégano silvestre del Alto Patía. También es conocido que los compuestos fenólicos poseen actividad antifúngica y antimicrobiana (Fleisher y Sneer, 1982; Lawrence, 1984; Tucker y Maciarello, 1994).

La finalidad de este estudio fue evaluar la actividad antioxidante y antifúngica del aceite esencial obtenido a partir del orégano silvestre (*L. origanoides* Kunth) de la región del Alto Patía. La actividad antioxidante se evaluó *in vitro* mediante los ensayos de DPPH• (2,2-difenil-1-picrihidrazil) y ABTS•+ (2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico) y la actividad antifúngica se estudió también *in vitro* utilizando el método de dilución en agar, frente al fitopatógeno *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary el cual afecta el cultivo de papa, un renglón importante de la agricultura del departamento de Nariño.

1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

El aceite esencial de orégano posee propiedades antioxidantes, antifúngicas y antibacteriales, (Muñoz *et al.*, 2007). Lo anterior encamina las investigaciones a tener resultados concluyentes acerca de estas actividades para contribuir en el desarrollo de productos o a su dosificación, que permita el aprovechamiento eficaz del aceite como preservante o aditivo nutracéutico en la industria alimenticia.

Entre el norte del departamento de Nariño y el sur del departamento del Cauca, se encuentra la región del Alto Patía, donde existen serios problemas de degradación de los recursos de suelo, agua y vegetación, lo cual ha traído consecuencias de variada índole: sociales, económicas y ambientales. Allí, la naturaleza sobrepasó los límites de autorregulación (proceso conocido como 'resiliencia') y, como parte de la degradación se desarrolló una nueva vegetación propia de regiones en avanzado proceso de desertificación (enclave subxerofítico). Además, la precipitación es escasa y en algunos años el fenómeno del Niño ha producido eventos de sequía muy prolongados, ocasionando desplazamientos masivos de la población, principalmente hacia la carretera Panamericana, donde algunos se han dedicado a mendigar y delinquir para poder sobrevivir.

Corpoica viene construyendo, junto con la comunidad, un programa de desarrollo humano endógeno y sostenible desde comienzos del año 2005. La subregión se dividió en cuatro microregiones. Una de ellas se denomina 'Cordón Panamericano' e incluye los municipios de Mercaderes, Taminango y El Rosario, en los cuales mediante un proceso participativo, se logró organizar a la comunidad en la "Asociación Vencedores del Verano". En el Programa de desarrollo se plantea la generación de fuentes alternativas de ingresos a partir de productos comercializables con mercado asegurado, basándose en especies vegetales permanentes, adaptadas a las condiciones de sequía y propias de la biodiversidad del Cordón Panamericano.

Una de estas especies es el orégano silvestre o de monte, como ellos generalmente lo denominan, planta herbácea que crece espontáneamente en la zona durante todo el año, el propósito es adelantar proyectos para el aprovechamiento de esta planta, en este sentido estudiantes de la Universidad de Nariño, de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial, trabajaron en la optimización del proceso de extracción mediante la técnica de arrastre con vapor de aceite esencial de orégano nativo del Alto Patía y determinaron el efecto de las

condiciones agroecológicas en su composición y rendimiento (Hurtado *et al.*, 2008).

Con el aceite esencial de *L. origanoides* Kunth obtenido, este proyecto se enfoca en la evaluación de sus propiedades, centrando la atención en cuanto a las actividades antioxidante y antifúngica, ésta última evaluada frente al patógeno *Phytophthora infestans* que ataca el cultivo de la papa.

Se hace importante determinar la viabilidad del uso del aceite esencial de orégano silvestre del Alto Patía para inhibir el crecimiento del patógeno *Phytophthora infestans*, ya que se constituye en una alternativa frente al uso de agroquímicos, lo que a su vez representa una opción de aprovechamiento agroindustrial de esta especie; dicha capacidad se atribuye a que el aceite de orégano posee compuestos fenólicos tales como timol y carvacrol, los cuales tienen propiedades antioxidantes y esto le confiere potencialidad para ser utilizado como aditivo en la conservación de productos alimenticios (Arcila *et al.*, 2004).

En este contexto con el presente proyecto se pretende responder a las siguientes preguntas:

¿La actividad antioxidante del aceite esencial de las hojas de orégano silvestre (*L. origanoides* Kunth) del Alto Patía es significativa para su posible utilización como aditivo en la conservación de productos alimenticios?

¿El aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides* Kunth) del Alto Patía posee un buen efecto inhibitorio *in vitro* frente al crecimiento del fitopatógeno *Phytophthora infestans* causante de la gota de la papa?

2. JUSTIFICACIÓN

La región del Alto Patía es una zona socialmente deprimida con problemas de sequía, donde crece de manera silvestre una especie de orégano de la cual se puede extraer un aceite esencial que tiene un gran potencial comercial por presentar comprobados efectos antimicrobianos y antioxidantes.

Diversos estudios apuntan a la presencia de compuestos como timol y carvacrol presentes en el aceite esencial de orégano (*L. origanoides* Kunth) capaces de ser usados como antioxidantes, antifúngicos y antibactericidas. Actualmente se ha aumentado el auge de los antioxidantes especialmente los de origen natural, ya que presentan menores efectos secundarios que los químicos; es por esta razón que las investigaciones se han encaminado a evaluar esta capacidad de diferentes aceites esenciales para ser utilizados en la industria alimentaria.

La “gota o tizón tardío” causado por el patógeno *Phytophthora infestans*, se constituye en el agente fitopatológico más perjudicial de la papa en las zonas húmedas del mundo (PROINPA, 2006) y en Colombia, se reporta como el limitante de mayor incidencia en el cultivo (Lagos, 2002), debido principalmente a condiciones climáticas favorables para el desarrollo del patógeno y a la siembra de materiales altamente susceptibles, como las variedades Diacol, Capiro, Parda, Pastusa, ICA, Nevada y Tuquerreña (Jaramillo, 2004). Otro autor señala que el uso de pesticidas es por tradición la única alternativa de control ante éste problema fitosanitario (Rodríguez, 1996), sin embargo, el uso excesivo trae como consecuencias problemas ambientales de diferente tipo.

Es importante la exploración de nuevas alternativas de control de este patógeno ya que afecta el cultivo más importante de Nariño disminuyendo los ingresos de los agricultores. Como posible solución a esta problemática algunas investigaciones han reconocido en los extractos de diferentes especies de plantas, su propiedad fungicida, entre ellos de destaca los extractos obtenidos a partir de la *Cúrcuma longa* L. que fue utilizado para el control de hongos fitopatógenos como *Alternaria brassicicola*, *Aspergillus flavipes*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium sphaerospermum* y *Fusarium oxysporum* (Da Cunha, 2006).

La generación de conocimientos acerca de la capacidad antioxidante y antimicrobiana frente *Phytophthora infestans* del aceite esencial de orégano silvestre del Alto Patía, abriría la posibilidad para su comercialización orientada a la industria de alimentos y al sector de insumos naturales para el sector agrícola,

generando valor agregado a cultivos no tradicionales que representen una fuente alterna de ingresos para las familias de la región del Alto Patía, contribuyendo a la reducción de la problemática social de pobreza, a la no generación de los cultivos ilícitos y al desarrollo regional.

Cabe mencionar que este trabajo de investigación forma parte y da continuidad al proyecto general "Utilización de Aceites Esenciales de Orégano Silvestre del Alto Patía como Aditivo Nutracéutico en Sistemas de Alimentación Animal", el cual fue aprobado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antioxidante y antifúngica del aceite esencial de orégano silvestre (*Lippia origanoides* Kunth) del Alto Patía.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la actividad antioxidante del aceite esencial de orégano silvestre (*Lippia origanoides* Kunth) del Alto Patía mediante los métodos DPPH• y ABTS•+.
- Evaluar mediante ensayos de DPPH• y ABTS•+ la capacidad de captura radical de los antioxidantes convencionales ácido ascórbico, BHA y BHT y compararla con la del aceite esencial *Lippia origanoides* Kunth.
- Evaluar la actividad antifúngica *in vitro* del aceite esencial de orégano silvestre (*Lippia origanoides* Kunth) del Alto Patía frente al fitopatógeno *Phytophthora infestans*.

4. MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE

4.1 EL ORÉGANO

4.1.1 Características generales. El orégano (*origanum vulgare*) es una planta de Europa y de Asia occidental. Su nombre, que deriva del griego, significa, "esplendor de la montaña".

Existen básicamente dos tipos de orégano: orégano europeo (mejorana, orégano común, etc.) nativo de la región mediterránea y el orégano americano (Suramérica o México) pertenecientes al género *Lippia* (*L. origanoides*, *L. graveolens*, entre otras), los cuales se destacan por su alto contenido de compuestos fenólicos (timol y carvacrol) (Goren, *et al.*, 2003; Vernin *et al.*, 2001). El género *Lippia* (*Verbenaceae*) incluye aproximadamente 200 especies de hierbas y arbustos. Las especies están especialmente distribuidas en países de América Central (México, Guatemala, Cuba) y América del Sur (Venezuela, Brasil, Colombia). Muchas de ellas son tradicionalmente utilizadas como remedio para afecciones gastrointestinales y respiratorias, además las hojas de la mayoría de estas especies son utilizadas como condimentos en la preparación de alimentos.

El orégano silvestre cuyo nombre científico es *Lippia origanoides* Kunth y que pertenece a la familia de las *Verbenaceae*, es un arbusto aromático, con olor a orégano en la mayoría de quimiotipos, ocasionalmente cítrico, artemisa de hasta 3,5m alto, presenta hojas ovadas con el ápice redondeado, flores blancas, pequeñas y muy aromáticas; el rendimiento de extracción del AE según Dos Santos, es de 4,6% (p/p). Algunos de los sinónimos de esta especie botánica, son: *Lippia berterii* Spreng y *Lantana origanoides* H.B.K. (Celis *et al.*, 2007).

4.1.2 Taxonomía de *Lippia origanoides* Kunth.

<u>Reino</u>	Plantae
<u>División</u>	Magnoliophyta
<u>Clase</u>	Magnoliopsida
<u>Orden</u>	Lamiales
<u>Familia</u>	Verbenaceae
<u>Género</u>	<i>Lippia</i>
<u>Especie</u>	<i>Lippia origanoides</i>

4.1.3 Producción Nacional e Internacional de orégano. Los principales productores de orégano son Turquía, Grecia e Israel, en Latinoamérica sobresalen Chile y Perú; México a su vez presenta altos niveles de producción del

denominado "orégano mexicano" (*L. graveolens*) que corresponde a un producto con unas características específicas y similares a las encontradas en Colombia. En cuanto a los importadores se destaca Estados Unidos con más del 10% del volumen total, seguido por la Unión Europea, especialmente Alemania, Italia, Francia y España. En Sudamérica los principales importadores son Brasil, Uruguay y Argentina. Este panorama muestra el orégano como condimento, pero no en el papel de sus bio-componentes funcionales.

En nuestro país, esta especie se encuentra en Cauca, Cundinamarca, Guajira, Magdalena, Santander y Norte de Santander, es un arbusto de hasta 3,5 m de alto; hojas ovaladas con el ápice redondeado, márgenes dentadas tanto por la haz como por el envés, pubescentes, con tricomas ferrugíneos, de 3,5 a 5 cm de largo, 1,5 a 2,3 cm de ancho; pecíolo de 1-1,5 cm de largo; inflorescencias cortas, axilares, apretadas, con flores blancas, pequeñas y muy aromáticas (García, 1992).

4.1.4 Composición y usos potenciales. El uso más común de las especies de *Lippia* es para el tratamiento de desórdenes respiratorios, con este fin la planta es usualmente preparada en forma de infusión. En Sur América también es empleada como remedio para resfriados, gripe, bronquitis, tos y asma. Es el caso de *L. organoides* cuyas hojas son utilizadas como condimentos en la preparación de alimentos, y en forma de infusión para el tratamiento de la diarrea, como analgésico, antiinflamatorio y antipirético. (Morton, 1981). Se ha reportado propiedades como antiséptico, antioxidante, antimicrobial, antiviral, expectorante pulmonar, anti inflamatorio, analgésico y anestésico; antibiótico natural, fungicida, antiespasmódico, anti parasitario, tonificante del sistema nervioso, tiene propiedades desinfectantes y cicatrizantes frente a infecciones dérmicas, mejora la digestión estimulando el flujo de bilis, antidiabético, antídoto, fortalecedor del sistema inmunológico. (Arcila *et al.*, 2004).

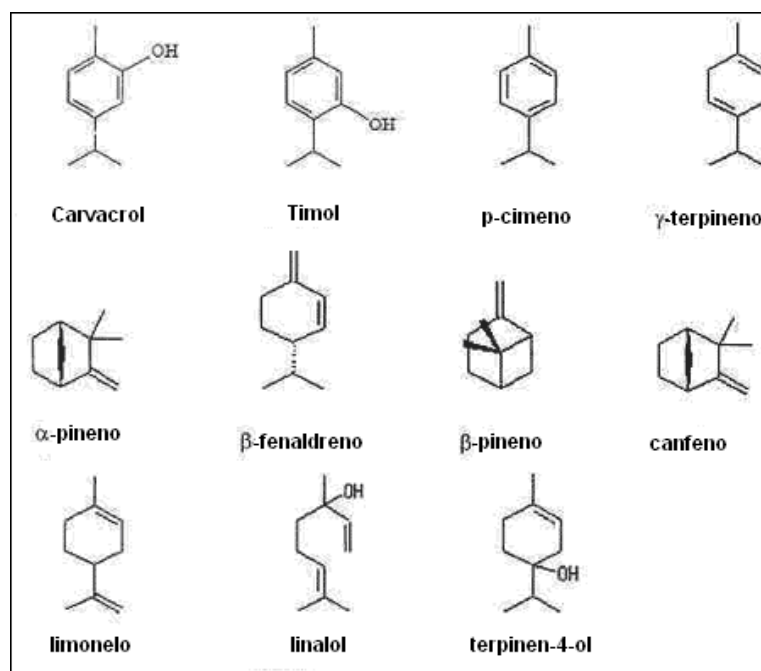
L. organoides Kunth, pertenece a la familia Verbenácea, esta familia se caracteriza por la gran variabilidad de usos que presentan sus especies, algunas de las cuales son de gran aplicación en la farmacéutica, alimentos, textiles y sobre todo, cosmética y perfumería debido a su alto contenido de aceites volátiles, de interés industrial. Así mismo, se ha demostrado que los aceites esenciales presentes en *L. organoides*, poseen actividad antimicrobial contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Candida tropicalis*. Además, las hojas de *L. organoides* son usadas como sustituto del orégano común.

L. organoides se conoce en Colombia como "orégano de monte" y junto con otras especies de similar nominación, varios autores han reportado un alto contenido de

los monoterpenos timol y carvacrol (Montoya, 2007). Por lo menos 36 especies pertenecientes a diferentes géneros que son llamadas “orégano” son usadas como condimentos, la presencia del aceite esencial y su composición en estas especies determinan el aroma y el sabor de estos condimentos. De esta manera, la composición química de los aceites esenciales es el criterio más importante para establecer la cualidad de condimento de una especie y definir la calidad del mismo.

Existen diversos estudios sobre la composición química del orégano, usando extractos acuosos y sus aceites esenciales. Se han identificado flavonoides como la apigenina y la luteolina, agliconas, alcoholes alifáticos, compuestos terpénicos y derivados del fenilpropano. En el *O. vulgare* se han encontrado ácidos coumérico, ferúlico, caféico, *r*-hidroxibenzóico y vainillínico. Los ácidos ferúlico, caféico, *r*-hidroxibenzóico y vainillínico están presentes en *O. onites*. Los aceites esenciales de especies de *Lippia* contienen limoneno, -cariofileno, -cimeno, canfor, linalol, -pineno y timol, los cuáles pueden variar de acuerdo al quimiotipo. La Fig. 1 presenta las estructuras químicas de algunos de los compuestos principales presentes en el orégano (Martínez, 2003).

Figura 1. Estructura química de los principales componentes del orégano (Martínez, 2003).



4.2 MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Los antioxidantes son compuestos que pueden retrasar la oxidación de las moléculas al inhibir la propagación de la reacción en cadena oxidativa. La actividad antioxidativa de los compuestos fenólicos se debe a sus propiedades redox, que pueden jugar un importante rol en absorber y neutralizar radicales libres, apagando radicales de oxígeno o descomponiendo peróxidos.

Los antioxidantes de los alimentos pueden ser definidos como cualquier sustancia que es capaz de aplazar, retardar o prevenir el desarrollo de ranciedad en el alimento u otro deterioro del flavor que se produzca como consecuencia de la oxidación. Los antioxidantes retardan el desarrollo de sabores inadecuados prolongando el periodo de inducción por lo que su adición al final de este periodo no consigue retardar el desarrollo del enranciamiento. (Pokorny *et al.*, 2001).

Se distinguen dos tipos de antioxidantes:

Antioxidantes Sintéticos: los más usados, son los compuestos fenólicos como el hidroxianisol butilado (BHA), el hidroxitolueno butilado (BHT), la butilhidroquinona terciaria (TBHQ), y los ésteres del ácido gálico, como el galato de propilo (PG). Estos antioxidantes contienen sustituciones alquílicas para mejorar su solubilidad en grasas y aceites. De acuerdo a las normas de buenas prácticas de producción el uso de éstos cuatro antioxidantes sintéticos está limitado al 0,02% del contenido de grasa o aceite del alimento (Simic, 1981).

Antioxidantes Naturales: el uso empírico de los compuestos naturales como antioxidantes es muy antiguo. La popularidad del ahumado y el especiado como métodos caseros para la preservación de carne, el pescado y otros alimentos ricos en grasa puede deberse, al menos en parte, al conocimiento de que estos tratamientos poseen un efecto retardante sobre el enranciamiento. Los antioxidantes naturales se encuentran presentes en prácticamente todas las plantas, microorganismos, hongos, e incluso en los tejidos animales. La mayoría son compuestos fenólicos entre los cuales los grupos principales son los tocoferoles, los flavonoides y los ácidos fenólicos (Pokorny, 1999).

4.2.1 Métodos de captura de radicales. La captura de radicales es el principal mecanismo de acción de antioxidantes en los alimentos, se han desarrollado muchos métodos en los que se mide la capacidad antioxidante a través de la captura de los radicales libres sintéticos en solventes orgánicos polares, por ejemplo

los radicales catiónicos ha cambiado muchas veces. El método más reciente consiste en el uso de persulfato potásico para oxidar el ABTS•+ y su radical catiónico (Pellegrini, 1999).

4.3 LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN ACEITES ESENCIALES

Las propiedades antioxidantes de una especie de planta pueden ser potencializadas a través de la aplicación de su extracto fenólico, asimismo de otras fracciones como de su oleorresina o su aceite esencial en productos farmacéuticos, alimenticios y cosméticos (Correa, 2006).

Dado el aprovechamiento que se puede obtener de los antioxidantes, en los últimos años se han dirigido estudios en la búsqueda de antioxidantes naturales para reemplazar los sintéticos y conociendo que la acción antioxidante se atribuye a la relación entre timol y carvacrol, muchos estudios se han dirigido a la determinación de la composición química del género *Thymus*, *Origanum*, *Satureja*, *Thymbra* y *Lippia*, sabiendo que éstos poseen en cantidades significativas éstos componentes.

Revisando la literatura se ha encontrado diferentes estudios para determinar la actividad antioxidante de los aceites esenciales:

Un estudio realizado en mayo de 2007 en la Universidad Industrial de Santander, muestra que la composición química del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth, difundida en la Costa Colombiana, tiene safrol, 94,0% (hojas) y 90,3% (inflorescencias) y miristicina, 3,2% (hojas) y 5,8% (inflorescencias), se encontró que en comparación con la vitamina C, este aceite esencial no es un buen antioxidante dada la no existencia de compuestos fenólicos y que su escasa actuación se debe a la presencia de hidrógenos arílicos (García *et al.*, 2007).

Para el caso del orégano Tafur *et al.*, concluyen que la acción antioxidante de este se debe a tres factores:

1) La presencia de compuestos fenólicos como timol y carvacrol, que puede ejercer actividad similar al eugenol, BHA, BHT y vitamina E. Ésta es la causa fundamental por la que el aceite esencial de orégano presenta actividad antioxidante (Pokorny *et al.*, 2001; Puertas *et al.*, 2002; Brand- Williams *et al.*, 1995).

- 2) La presencia de hidrocarburos antioxidantes monoterpenos y/o sesquiterpenos, que también pueden actuar como antioxidantes; también se considera que los aceites esenciales que no contienen fenoles, presentan actividad antioxidante
- 3) El efecto sinérgico entre los componentes del aceite esencial y el medio. Es decir, que algunos compuestos que no presentan actividad antioxidante notoria, al ser mezclados, pueden aumentar la capacidad de las moléculas que sí son antioxidantes.

En este estudio los componentes mayoritarios presentes en el aceite esencial de *Origanum vulgare* L. fueron carvacrol (51,4%), p-cimeno (10,0%), trans- α -cariofileno (6,4%) y α -bergamoteno (3,1%). (Tafurt *et al.*, 2005)

En la Tercera Reunión Nacional Sobre Orégano realizada en el 2007 en México, se expuso un estudio acerca de la actividad antioxidante del aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia berlandieri* Schauer) frente a las grasas; los resultados arrojaron como conclusión que la muestra del aceite esencial con mayor cantidad de carvacrol tiene mejor actividad antioxidante que las otras muestras. Se concluye que la concentración del compuesto fenólico en el aceite esencial está directamente relacionada con su actividad antioxidante (Chaquilla *et al.*, 2008).

En otro estudio se determinó que la capacidad antioxidante de los aceites esenciales de cuatro especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol fue: orégano cimarrón > tomillo > orégano común > orégano de castilla. La capacidad antirradicalaria del aceite esencial de orégano cimarrón fue 2,4 veces mayor que la capacidad del aceite esencial de Tomillo. Los ensayos también mostraron que la actividad antioxidante del aceite esencial de orégano cimarrón o silvestre es mayor a la capacidad antirradicalaria del antioxidante sintético BHT (Muñoz *et al.*, 2007).

En otras especies diferentes al orégano, por ejemplo el arrayán, se encontró que la actividad antioxidante de su aceite esencial era debida a la presencia de geraniol, siendo dicha actividad muy semejante a la de la vitamina C y proporcional a la concentración del aceite esencial frente al DPPH• (Carhuapoma *et al.*, 2005).

Se ha evaluado la actividad antioxidante de aceites esenciales utilizando varios métodos, algunos de los cuales se mencionan a continuación:

- Evaluación en sistemas alimenticios.

En un estudio, presentado en la Tercera Reunión Nacional Sobre Orégano (2007), se evaluó la actividad antioxidante del orégano mexicano (*Lippia berlandieri* Schauer) frente a las grasas. Se emplearon tres muestras diferentes del aceite esencial y dos concentraciones (0,15%-0,30%), en dos sistemas alimenticios: aceite de oliva y aceite de soya sin refinar, comparados con un negativo (sin antioxidante) y un positivo (BHT al 0,02%); luego la capacidad antioxidante se midió en valores de peróxido y los ácidos grasos libres en función del tiempo (Chaquilla *et al.*, 2008).

- Medición del valor peróxido.

Se hizo una evaluación acerca de la actividad del antioxidante de los residuos no-volátiles del aceite esencial de naranja, se midió el valor del peróxido obtenido después calentar el aceite a 70 °C durante 48 h, se aislaron seis compuestos y se purificaron, cuatro de éstos tenían actividad antioxidante: se identificaron tocoferol y tres flavonas metoxiladas usando los métodos de espectroscopia. Este estudio confirmó que estos fragmentos no-volátiles de aceite esencial de naranja contienen antioxidantes naturales diferentes (Vargas, 2009).

- Cuantificación de Hexanal.

Otra forma de comprobar la actividad antioxidante es tomando como indicador el hexanal, compuesto volátil generado durante el deterioro oxidativo de los ácidos grasos insaturados. En 2005 se realizó una investigación cuyo objetivo fue evaluar las actividades antioxidantes in vitro de los aceites esenciales de *Origanum vulgare* L., *Rosmarinus officinalis* L. y *Coriandrum sativum* L. contra el deterioro oxidativo causado por radiación UVA-VIS en emulsiones de Ag/Ac (margarina) y Ac/Ag (aceite vegetal). El estudio mostró que el aceite de orégano presentó mayor protección, seguido por los de cilantro y romero; así mismo que en la emulsión de Ag/Ac el aceite esencial de orégano exhibió mayor actividad antioxidante que la vitamina E para concentración de 1, 10 y 20 g/Kg (Taufert *et al.*, 2005).

- Método de la oxidación acoplada de β -caroteno y ácido linoleico.

En el estudio acerca de la "Actividad antioxidante de extractos de *Origanum vulgare* obtenido con dióxido de carbono supercrítico", se utilizó este método (Navarro Días *et al.*, 2007). La emulsión se preparó con 2 g de β -caroteno diluido en 10 mL de cloroformo, después se adicionó 1ml de esta solución a un frasco con 20 mg de ácido linoleico y 200 mg de Tween 40. Esta nueva solución fue concentrada con un rotaevaporador a vacío (50°C, $1,2 \cdot 10^{-2}$ MPa) después se removió con cloroformo, 50 mL de agua destilada oxigenada fue adicionada al frasco con vigorosa agitación; la oxigenación del agua destilada fue hecha con aire burbujeante constante durante 30 min.

Se adicionaron 5 mL de la emulsión diluida para cada serie de tubos que contienen 0,2 mL de la solución etanólica antioxidante (7,5 mg de extracto/1ml etanol). Los tubos fueron puestos en baño de agua (50°C). La reacción fue monitoreada leyendo la absorbancia en espectrofotómetro en 0, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos. La absorbancia leída fue hecha por triplicado usando una longitud de onda de 470 nm. El cero fue leído tomado inmediatamente después de la adición de la solución antioxidante. Duplicados para todos las determinaciones fueron hechas. La actividad antioxidante fue calculada usando la ecuación.

$$AA = \left[1 - \frac{Abs_s^0 - Abs_s^t}{Abs_c^0 - Abs_c^t} \right] * 100 \quad (3)$$

Donde

AA = Actividad Antioxidante (%)

Abs_s^0 = Muestra de absorbancia al iniciar la reacción (t=0)

Abs_c^0 = Control de Absorbancia al inicio de la reacción (t=0).

Abs_s^t = Muestra de la absorbancia de la reacción en el tiempo.

Abs_c^t = Control de absorbancia de la reacción en el tiempo.

Existen diversidad de ensayos para determinar la actividad antioxidante, pero en ocasiones la aplicación de metodologías inadecuadas y la insuficiencia de conocimiento respecto a las propiedades antioxidativas que los test miden, comprometen la veracidad de la información respecto al potencial antioxidante de determinados compuestos (Correa, 2006).

4.4 MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

- Técnica de difusión en agar.

El método consiste en aplicar una cantidad determinada del extracto en estudio en un disco de papel sobre la superficie de la placa donde se ha distribuido el inóculo con el microorganismo sobre el que se quiere ver el poder antifúngico. Por el gradiente de concentración, el extracto difunde alrededor del disco. La sensibilidad del microorganismo al extracto se relaciona con el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento. Según el diámetro del halo de inhibición, los microorganismos se clasifican en: no sensibles ($d < 8$ mm), sensibles (9 mm $< d < 14$ mm), muy sensibles (14 mm $< d < 19$ mm) y extremadamente sensibles ($d > 20$ mm). (Roura, 2003).

- Método de dilución en medio de cultivo y en agar.

El extracto se incorpora al medio con agar cuando aún está líquido. Para lograr el rango de dilución deseado se preparan una serie de placas con diferentes concentraciones del extracto. Los resultados se expresan como Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) la cual se define como la menor concentración del extracto que produce el 90% de reducción en el crecimiento de las colonias. Si se usan medios líquidos, el procedimiento es el mismo, sólo que se usan tubos de ensayo para las diferentes diluciones (Roura, 2003).

4.5 LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES

En varias investigaciones se ha demostrado que los aceites esenciales poseen propiedades antibacterianas, antimicóticas, antiparasitarias e insecticidas. Algunos de los aceites esenciales que han sido ensayados en alimentos son: eucalipto (*Eucalyptus*), romero (*Rosmarinus officinalis*), menta (*Mentha piperita*), rosa mosqueta (*Rosa moschata*), trébol (*Trifolium pratense*), limón (*Citrus limonum*), orégano (*Origanum vulgare*), etc.

A continuación se muestran algunos de estos estudios de actividad antimicrobiana con diferentes tipos de aceite esencial.

Se evaluó la actividad antimicrobiana de aceites esenciales de frutas verdes y las hojas de la variedad de hinojo *Foeniculum vulgare Mill. subsp. Vulgare* recogido en el Alentejo, la región de Évora. En este estudio, se realizó la extracción del aceite esencial por hidrodestilación y su análisis se llevó a cabo por GC-FID y GC-MS. Fueron identificados como componentes mayoritarios anetol en el aceite de las hojas y frutos, y estragol -felandreno en las semillas. La actividad antimicrobiana de los aceites fue evaluada contra las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces spp.*, *Fusarium oxysporum* y *Penicillium sp.* Los aceites esenciales mostraron actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus spp* *S. cerevisia* y *Fusarium oxysporum* (Tinoco et al., 2006).

En otro estudio se evaluó la actividad in vitro anti cándida y anti aspergillus de aceites esenciales de plantas de la familia *piperaceae*, los cuales mostraron una buena capacidad de inhibición de las cepas evaluadas (Mesa et al., 2007).

En cuanto a la actividad antifúngica, existen diferentes aceites esenciales que han sido evaluados, se tiene el aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*

Blume) y Orégano (*Origanum Vulgare* L.) sobre *Aspergillus flavus* y la producción de Aflatoxinas en nuez pecanera (García, *et al.*, 2006); también está el aceite esencial de las hojas de *Aloysia gratissima* (Gilles y Hook) que fue evaluado contra los fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporium* y *Botrytis cinerea*, se encontró que era efectivo contra los dos últimos fitopatógenos (Carvalho, 2005). Otro aceite esencial con gran capacidad antifúngica es el de *P.sanctifelisis* proveniente de especies de orégano *Pipper*, para *C. krusei*. (Mesa, *et al.*, 2007); también se encuentra el aceite esencial de *Tanaecium Nocturnum* (Barb. Rodri.) Bur. y K. frente al *Aspergillus flavus* aislada desde nueces de Brasil (*Bertholletia Excelsa*) (Pimentel, 2007). El aceite esencial de Tomillo (*Thymus vulgaris*) y de limoncillo (*Cymbopogon citratus*) ha mostrado actividad contra *Colletotrichum acutatum*. (Alzate, *et al.*, 2008).

Además de los aceites se encuentran extractos vegetales con gran actividad antifúngica como el caso del extracto vegetal metanólico de mejorana (*Origanum majorana* L.), frente a *Phytophthora infestans* (Gamboa, 2002), el cual presenta una eficiente actividad fungicida.

Haciendo una referencia sobre los estudios realizados específicamente con el aceite esencial del orégano se encuentra que:

Dos Santos *et al.*, (2004) evaluaron los componentes antibacterianos y antifúngicos del aceite esencial de *Lippia organoides* HBK y analizaron su actividad frente a las bacterias gram-positivas *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus aureus* MRSA, la bacterias gram-negativa *Escherichia coli* y los hongos *Candida albicans* y *Candida tropicalis*, los resultados mostraron actividad antimicrobiana significativa contra todos los microorganismos evaluados (Dos Santos *et al.*, 2004).

En otro estudio se realizó una evaluación *in vitro* de diferentes extractos de orégano sobre el crecimiento de *Xanthomona campestris*, *Cladosporium cladosporioide* y *Aspergillus niger*, especies que atacan diversos cultivos de hortalizas, entre ellos al jitomate. Se observaron diferencias significativas entre los extractos utilizados como tratamientos, la inhibición de los hongos *Aspergillus niger* y *Cladosporium cladosporioide* se evidenció por la reducción del crecimiento micelial (Ku Ucan, 2008).

Oliveira, *et al.* (2005) realizaron un estudio del aceite esencial de *Lippia organoides* HBK (Verbenaceae). Se analizó la composición química del aceite esencial de las hojas, por GC y GC / MS, el cual mostró un alto contenido de monoterpenos oxigenados (66,0%), carvacrol (38,6%) y timol (18,5%) como

principales constituyentes. La actividad antimicrobiana de este aceite esencial se determinó por el método de difusión en placa, mostrando zonas de inhibición muy importantes para todos los microorganismos probados (Oliveira *et al.*, 2005).

En otra investigación se evaluaron los aceites esenciales obtenidos de hojas y flores de diferentes muestras de *L. origanoides* cultivadas en el Valle del Cauca, se les determinó la capacidad *in vitro* para inhibir el crecimiento micelial y la formación de esclerocios de *S. cepivorum*, patógeno causante de la pudrición blanca en cebolla. Todos los aceites evaluados mostraron efecto inhibitorio tanto en el crecimiento micelial como en la formación de esclerocios en un rango de 250-1350 $\mu\text{L/L}$, sin embargo, aquellos obtenidos a partir del quimiotipo I presentaron el mayor poder inhibitorio en el crecimiento del micelio (CMI = 120 $\mu\text{L/L}$) y en la formación de esclerocios. El estudio concluyó que *L. origanoides* puede usarse potencialmente para el control de la pudrición blanca en cebolla (Álvarez *et al.*, 2007).

4.6 FITOPATÓGENO *Phytophthora infestans*

El tizón tardío de la papa causado por *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, es una de las enfermedades más devastadoras de la papa a nivel mundial. En 1845 causó en Irlanda la destrucción total de los campos de papa, que eran la principal fuente alimenticia de ese país, produciendo la muerte de miles de personas y la migración de muchos sobrevivientes a otros lugares de Europa y Norte América. (Pérez *et al.*, 2008).

4.6.1 Taxonomía y clasificación *Phytophthora infestans* (Jaramillo, 2004).

<u>Reino</u>	Cromista (grupo stramenophyle)
<u>Phylum</u>	Oomycota
<u>Clase</u>	Oomycete
<u>Subclase</u>	Perenosporomycetidae
<u>Orden</u>	Phythiales
<u>Familia</u>	Pythiaceae
<u>Genero</u>	Phytophthora
<u>Especie</u>	infestans

El desarrollo epidémico del “tizón tardío”, depende en gran parte del efecto que tiene la humedad relativa y la temperatura sobre las distintas etapas del ciclo de vida de *P. infestans*. La germinación de los esporangios se reproduce a humedades relativas superiores al 90%, con una temperatura optima entre 10-15°C, rango en el cual el fitopatógeno se desarrolla adecuadamente, esporula y

libera las zoosporas, las cuales germinan y penetran en el tejido a través de estomas, lenticelas y heridas, produciendo nuevamente la enfermedad (Agrios, 2002).

Los primeros síntomas se presentan como manchas de color verde claro a oscuro en los bordes de las hojas inferiores. Estas manchas se extienden rápidamente, formando zonas pardas y atizonadas con bordes irregulares. En el envés de las hojas aparece la cenicilla vellosa, constituida por las hifas y los esporangios del patógeno. Los folíolos afectados finalmente pierden consistencia y se necrosan. En condiciones de alta humedad y temperatura fría, las lesiones se expanden rápidamente, pudiendo afectar la totalidad de órganos aéreos de la planta, provocando una marchites progresiva (Torrez, 1997).

Los síntomas en los tallos infectados se caracterizan por las lesiones necróticas de color marrón oscuro generalmente ubicadas desde el tercio medio a la parte superior de la planta, presentan consistencia vítrea, de tamaño variable (hasta 10 cm de largo). Como consecuencia, las hojas se enrollan, los tallos se tornan quebradizos y pueden romperse con la fuerza del viento o con el rozamiento de las máquinas o personas que transitan por el campo (Torrez, 1997; Pérez y Forbes, 2008).

Los tubérculos afectados muestran una pudrición de consistencia dura, externamente se observan lesiones descoloridas de forma y tamaño variables, al cortar los tubérculos enfermos se observan manchas irregulares de color marrón claro, de tamaño y forma variables y de consistencia corchosa (Torrez, 1997).

Actualmente para el control de este patógeno se emplean fungicidas que normalmente sólo se utilizan de manera preventiva. En las variedades susceptibles, a veces las aplicaciones de fungicidas pueden ser necesarias una vez a la semana. Metalaxyl, es un fungicida que se comercializa para su uso contra *P. infestans*, pero sufre problemas de resistencia grave cuando se utiliza por sí solo, la presentación comercial viene en mezcla con Mancozeb, el cual tiene actividad protectante en el manejo del patógeno. (Syngenta, S.A.)

Los biocidas y/o bioinsumos son productos de origen natural que se utilizan para el manejo y control de plagas y enfermedades en la agricultura orgánica. Estos se consideran ambientalmente benignos porque se degradan rápidamente y su efecto sobre los organismos benéficos es menos perjudicial que el de productos tradicionales (O'farril, 2004).

En la naturaleza existen una gama muy amplia de plantas que producen una diversidad de metabolitos tóxicos, tal característica les permite a éstas plantas actuar como antagonistas de patógenos bióticos y plagas. Su potencial antagonista se lo puede aprovechar mediante la preparación de extractos o infusiones a partir de sus tejidos con resultados promisorios en laboratorio e invernadero (Zabaleta, 2000; Frayre, 1993; Granada, 2002).

5. DISEÑO METODOLOGICO

5.1 MATERIAL VEGETAL

La materia prima (hojas secas de orégano) fue suministrada por la asociación Vencedores del Verano, que fue previamente capacitada para la colecta del material biológico. Se recogieron las hojas maduras de plantas de orégano silvestre (*L. origanoides* Kunth), entre las hileras uno y diez contadas de abajo hacia arriba, sin cortar la rama, con el objeto de no destruir la planta. Estas se colectaron en cuatro veredas (Alto del Mayo, San Juanito, El Cardo, Las Juntas-Viento Libre) del área subxerofítica denominada Cordón Panamericano del Alto Patía, ubicadas en los municipios de Taminango en el Norte del Departamento de Nariño y Mercaderes al sur de Cauca. La identificación taxonómica de las muestras se realizó en el Herbario de la Universidad de Nariño.

El material vegetal (solo hojas) fue pesado, separado de piedras, impurezas y otros elementos extraños y se dejó secar a la sombra a temperatura ambiente por espacio de ocho días. Luego se trituro en un molino de martillos y se tamizó utilizando una serie de tamices estándar.

Para satisfacer los requerimientos de buenas prácticas se mantuvo registros del origen del material vegetal y se siguió las recomendaciones de la “Guía Para la Colecta de Materiales del Hábitat Natural”, elaborada por Corpoica, la cual se usó como base para una capacitación realizada a los miembros de la citada asociación con el fin de instruirlos en la técnica de recolección del material vegetal.

Las observaciones realizadas en campo indican que se deben recoger las hojas de las diez primeras ramas del suelo hacia arriba, con el objeto de que no se destruya la planta ni se deje el suelo al descubierto, impidiendo la exposición de éste a la intensa radiación solar.

Se debe resaltar que se trata de plantas que crecen de forma silvestre y que no son sometidas a ningún tipo de práctica agronómica o de aplicación de agroquímicos. Las hojas son cosechadas de plantas maduras en la época posterior al periodo de lluvias debido a que es en este momento donde las plantas tienen mayor cantidad de hojas.

5.2 PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ACEITE

El proceso de extracción del aceite esencial de las hojas de orégano se realizó en la planta piloto de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial utilizando la técnica de arrastre con vapor, para lo cual se dispuso de un equipo de 80 litros de capacidad que consta de una canastilla para contener la muestra y un sistema de flautas en forma de cruz en la base a través de las cuales fluye el vapor generado en una caldera. El equipo de extracción se muestra en la Fig. 3.

Figura 3. Equipo de extracción por arrastre con vapor a nivel de planta piloto.



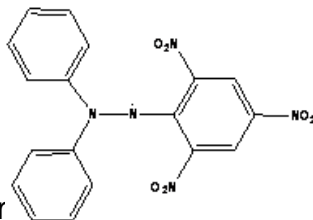
Una vez extraído el aceite esencial se deshidrató con Na_2SO_4 anhidro, se tomó una alícuota de 30 μL y se diluyó en 1 mL de diclorometano para el análisis cromatográfico.

5.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La actividad antioxidante que posee el aceite esencial de *L. origanoides* Kunth se evaluó mediante los métodos espectrofotométricos de DPPH• y ABTS•+. La evaluación por el método de DPPH• se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Cavero, S. (Cavero, 2003), y la evaluación por el método de ABTS•+ de acuerdo a la metodología de Re, R. (Re *et al.*, 1999).

5.3.1 Ensayo de DPPH•. 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•), cuya estructura química se muestra en la Fig. 4, con 95% de pureza.

Figura 4. Ecuación molecular de DPPH•.



Las medidas espectrofotométricas se realizaron a temperatura ambiente en un espectrofotómetro Genesys 10 UV-VIS Scanning 335907. Para la medición se

usaron cubetas de 1 cm x 1 cm x 4,5 cm. La longitud de onda seleccionada fue 516 nm. Diariamente, antes de cada medición se equilibró el espectrofotómetro durante 10 minutos. Para el blanco se utilizó etanol grado HPLC. Todas las mediciones se realizaron por triplicado. Se utilizó, asimismo, una alícuota de DPPH• sin muestra como control.

Para la preparación de la solución concentrada de DPPH• se pesaron 0,014 g de DPPH• y se disolvieron en 100 mL de etanol. Tras una agitación de diez minutos, se tomaron 20 mL se enrasó hasta 100 mL en etanol y se agitó de nuevo. La concentración inicial de DPPH• quedó así aproximadamente en $7,1 \times 10^{-5}$ M. Pero la concentración real en la reacción se obtuvo de extrapolar la medida de absorbancia en el espectrofotómetro cada día a tiempo 0 en la recta de calibrado que se menciona a continuación. El valor extrapolado se constituye en $C_{DPPH\bullet (t=0)}$. Hasta el momento de su uso se guardó en refrigeración y protegido de la luz. La duración máxima de la solución de DPPH• fue de ocho horas.

Se prepararon diluciones con diferentes concentraciones de DPPH• en etanol para obtener una recta de calibrado. Con el aceite esencial de orégano, se prepararon distintas concentraciones, desde 12,5µl/mL hasta 200µl/mL en medio de reacción etanol HPLC, se agitaron hasta su perfecta disolución. De la solución de DPPH• se tomaron alícuotas de 3,0 mL y se dispusieron en las cubetas del espectrofotómetro. Sobre las cubetas se añadió 30 µL de cada una de las concentraciones de la muestra se dejaron reaccionar, midiendo la absorbancia cada 5 minutos hasta la estabilización de la reacción. El valor que se obtiene se extrapoló en la recta de calibrado del DPPH•, para obtener el equivalente a la concentración de DPPH• a tiempo t, $C_{DPPH\bullet (t=t)}$.

El porcentaje de DPPH• remanente (% DPPH• rem) se obtuvo de la ecuación que se muestra a continuación:

$$\%DPPH_{rem} = \frac{C_{DPPH(t=t)}}{C_{DPPH(t=0)}} * 100 \quad (4)$$

Se representó el porcentaje de DPPH• remanente frente a concentración del aceite en el medio de reacción (mg/mL) y se determinó la ecuación de la recta obtenida por el método de regresión por mínimos cuadrados. En esta ecuación el valor correspondiente al 50% es la concentración eficaz al 50% o EC₅₀, que se define como la cantidad de antioxidante (mg/mL) necesario para reducir la concentración de DPPH• a la mitad.

También se calculó el porcentaje de Inhibición, según la ecuación (5), como sigue:

$$\%I = \frac{[A_0 - A_t]}{A_0} * 100 \quad (5)$$

Donde:

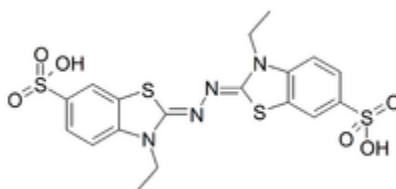
A₀ = Absorbancia en el tiempo 0

A_t = Absorbancia después de un periodo de tiempo en reposo.

Con la ecuación encontrada en la representación del porcentaje de inhibición frente a las concentraciones se calculó el valor IC₅₀ que corresponde al valor de la concentración que inhibe el 50% del radical libre.

5.3.2 Ensayo de ABTS•+. El (2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS•+)

Figura 5. Ecuación molecular del ABTS•+.



Las medidas espectrofotométricas se realizaron a temperatura ambiente en un espectrofotómetro Genesys 10 UV-VIS Scanning 335907. Para la medición se usaron cubetas de 1 cm x 1 cm x 4,5 cm. La longitud de onda seleccionada fue 734 nm. Diariamente, antes de cada medición se equilibró el espectrofotómetro durante 10 minutos. Para el blanco se utilizó etanol grado HPLC. Todas las mediciones se realizaron por triplicado. Se utilizó, asimismo, una alícuota de ABTS•+ sin muestra como control.

En un tubo de ensayo se mezcló la solución de ABTS•+ 7 mM y persulfato de potasio 2,45 mM en proporciones 1:1 (v/v). La solución de ABTS•+ fue preparada diluyendo la mezcla con etanol grado HPLC hasta alcanzar absorbancia 0,700+/- 0,050 en una longitud de onda de 734 nm. La solución fue almacenada en la oscuridad a temperatura ambiente durante 12-16 h antes de su uso.

La actividad antioxidante se expresó en porcentaje de inhibición, según la ecuación (5).

Otro indicador que se obtuvo es el TEAC (actividad antioxidante equivalente al Trolox, mM y mg/mL). Éste se calculó tomando la curva de patrón Trolox, la cual se preparó con soluciones del patrón variando entre 0 y 2 mM; la dilución de los radicales de ABTS•+ en función de las concentraciones de Trolox sigue una curva lineal. El Trolox se caracteriza por ser un antioxidante primario, actuando en el bloqueo de los radicales libres por medio de la donación del radical hidrogeno (Correa, 2006).

Entre los métodos utilizados para determinar la actividad de un antioxidante basados en la desactivación de radicales libres, el ensayo de decoloración del radical ABTS•+ es uno de los más aplicados, al considerarse un método de elevada sensibilidad, práctico, rápido y muy estable. El tiempo de incubación de la solución de ABTS•+ con la muestra se suele situar entre 1 y 7 minutos. Los resultados obtenidos por algunos investigadores indican que la reacción con el radical ABTS•+ no se completa hasta pasado 1 minuto, y según Re *et al.*, (1999) el tiempo de 4 minutos es el más apropiado. No obstante, Sellappan *et al.*, (2002), sugieren tiempos de medida de 6 minutos para los patrones de referencia y de 7 minutos para los compuestos puros, extractos de plantas o de alimentos.

5.4 EVALUACIÓN ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

5.4.1 Obtención del patógeno. El patógeno fue obtenido de aislamientos previos que se realizaron a las hojas de papa que se encontraban infectadas con *P. infestans*, para esto se realizaron cortes pequeños en las zonas visiblemente afectadas y posteriormente se realizó un lavado con hipoclorito y agua destilada; en cajas Petri de 9 cm se depositaron cuatro trozos de las hojas, para evitar el crecimiento de bacterias que contaminen el medio de cultivo, se adicionó a este una solución de Rifampicina® de 300 mg disuelta en 50 mL de etanol al 96%. Estas cajas se dejaron incubar durante tres días, posteriormente donde se observó un posible crecimiento *P. infestans* se repicó en otras cajas Petri con el fin de obtener un cultivo puro.

5.4.2 Preparación del medio de cultivo. El medio de cultivo se preparo utilizando los siguientes compuestos.

- 0,25 gr de CaCO₃
- 9 gr de agar
- 9 gr de azúcar
- 100 mL de jugo de tomate
- 100 mL de extracto de arveja

Se pesó el agar, el azúcar y el carbonato de calcio y se lo diluyó en 300 mL de agua destilada se calentó en baño maría hasta lograr que todos los compuestos estén homogéneos, posteriormente se pesó el extracto de arveja y el jugo de tomate y se aforó a 200 mL, en total se obtuvo 500 mL de medio de cultivo, el cual se esterilizó a 15 psi por 15 minutos en autoclave.

5.4.3 Inoculación en el medio de cultivo. El medio de cultivo esterilizado se sirvió en las cajas Petri enmendado según el caso: aceite esencial de orégano y Ridomil® Gold MZ 68 WP (Metalaxyl + Mancozeb) en concentraciones de 10, 50, 100, 150, 200 y 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, se dejó que el medio se solidificara y posteriormente se inoculó con un disco de micelio 1,1 cm de diámetro del patógeno, el cual se sembró en el centro de cada caja; en el caso del tratamiento del aceite esencial de orégano se utilizó Tween 20 como agente emulsificante, también se realizó un tratamiento únicamente con Tween 20 como testigo.

5.4.4 Incubación del patógeno. Las placas sembradas fueron incubadas a 18°C, la temperatura ideal de crecimiento de este patógeno durante 8 días. Pasado este tiempo se realizó la evaluación de los resultados de sensibilidad la cual se hizo en función del diámetro de inhibición de acuerdo al parámetro del diseño experimental que se describe a continuación.

5.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó un diseño irrestrictamente al azar (DIA) con arreglo factorial con dos factores, el factor A corresponde al Producto (aceite esencial de orégano y Ridomil® Gold -Metalaxyl-M 4% + Mancozeb 64%) y el factor B corresponde a las concentraciones (10, 50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Se tuvieron dos testigos, uno absoluto y otro aplicando Tween 20, se realizaron cinco repeticiones.

Se realizaron los siguientes tratamientos.

Cuadro 1. Tratamientos evaluados para la determinación de actividad antifúngica.

Tratamientos	Productos	Concentración ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
A	Metalaxyl + Mancozeb	10
		50
		100
		150
		200
		250
B	Aceite esencial de Orégano.	10
		50
		100
		150
		200
		250
C	Tween 20	10
		50
		100
		150
		200
		250
D	Testigo absoluto	0

El comportamiento *in vitro* de los aislamientos, se determinó, con relación al crecimiento radial de las colonias de *P. infestans* en los diferentes tratamientos. Se determinó el porcentaje de crecimiento utilizando la relación propuesta por Riveros (Riveros *et al.*, 2003):

$$PC = \frac{DMCM - 1.1cm}{DMCA} * 100 \quad (6)$$

Donde: PC = porcentaje de crecimiento
DMCM = diámetro medio colonia creciendo en tratamiento
1,1 cm = diámetro del cilindro con micelio
DMCA = diámetro medio colonia sin enmendar.

Finalmente se determinó la sensibilidad de los aislamientos evaluados mediante la escala propuesta por Shattock (1988) que se presenta en la Cuadro 2.

Cuadro 2. Escala de sensibilidad propuesta por Shattock.

Sensibles (S):	Menor del 10% del crecimiento del testigo
Intermedio (I):	Entre 10 y 60% del crecimiento del testigo
Resistente (R):	Mayor del 60% del crecimiento del testigo

5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar la significancia estadística de los tratamientos se utilizó la técnica de análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 5% ($P = 0,05$). El análisis de resultados fue realizado con apoyo de programa estadístico STATGRAPHICS Plus 5,0 (Statistical Graphics Corp.1994–2000).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL

Las condiciones de operación del equipo de extracción y el rendimiento obtenido se presentan en la Cuadro 3. El rendimiento se calculó a partir de la cantidad de aceite esencial obtenido por unidad másica de materia prima seca en términos porcentuales (g de aceite/100 g de materia prima).

Cuadro 3. Condiciones de extracción del aceite esencial de orégano y rendimiento obtenido.

Tiempo (h)	Densidad Lecho (g/L)	Presión de vapor (psi)	Rendimiento % p/p
2,0	80,0	0,32	3,27

Con la extracción por arrastre con vapor a nivel de planta piloto se obtuvo un rendimiento de 3,27% (p/p) de aceite esencial de orégano extraído el 8 de Octubre de 2009, con el cual se realizaron todos los ensayos de esta investigación.

6.1.1 Análisis cromatográfico. Para la identificación de los compuestos del aceite esencial de orégano se utilizó cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-FID). Los constituyentes del aceite se identificaron con base en sus patrones de fragmentación y sus índices de retención, utilizando el índice de Kovat's según la siguiente fórmula:

$$IK = 100 \left[n + (N - n) \frac{\log tr_x - \log tr_n}{\log tr_N - \log tr_n} \right] \quad (7)$$

Donde:

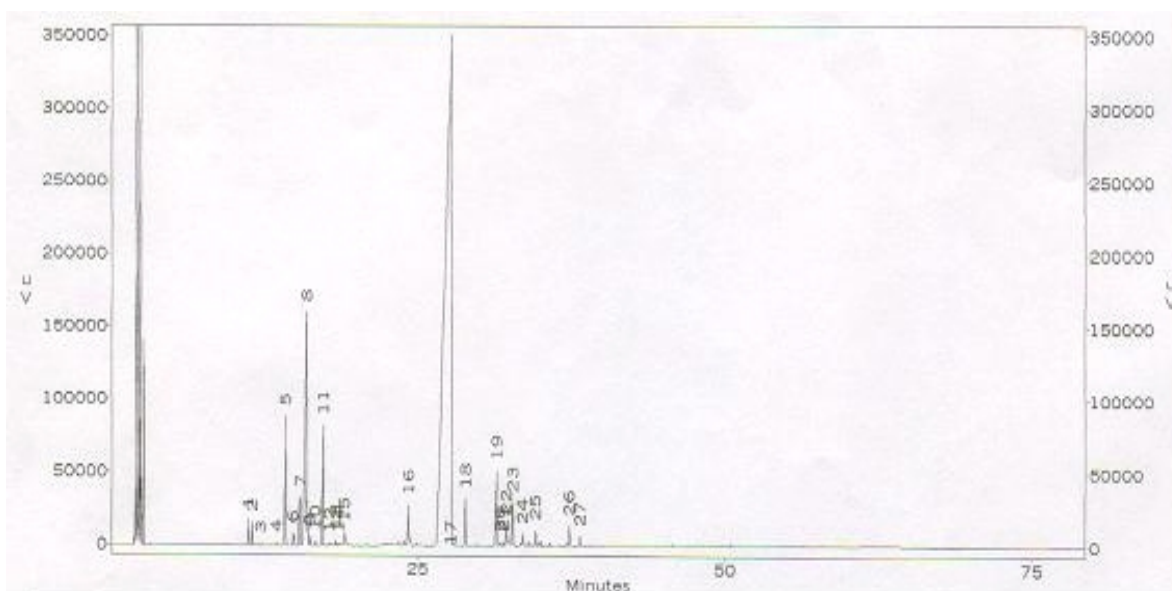
- IK = Índice de Kovat's.
- n = número de carbonos de la parafina anterior.
- N = número de carbonos de la parafina posterior.
- tr_x = tiempo de retención del compuesto a identificar.
- tr_n = tiempo de retención de la parafina anterior.
- tr_N = tiempo de retención de la parafina posterior.

Los índices de Kovat's se calculan teniendo en cuenta los tiempos de retención de una serie homóloga de hidrocarburos desde C₈ hasta C₂₅, analizados en el cromatógrafo de gases bajo las mismas condiciones operacionales que los aceites esenciales, empleando generalmente columnas con fases estacionarias polar y apolar (Celis *et al.*, 2007).

El valor arrojado en la ecuación para cada compuesto se lo comparó con tablas de índice de Kovat's estándar en la columna DB-5.

En la Fig. 6 se muestra el perfil cromatográfico obtenido para la muestra de aceite esencial de orégano y en la Cuadro 4 la composición con los porcentajes de área relativa.

Figura 6. Perfil cromatográfico del aceite esencial de orégano.



Cuadro 4. Composición del aceite esencial de orégano (*L. origanoides* Kunth) extraído por arrastre con vapor.

Nº pico	T. retención	% Área	IK e	Compuesto
1	11,258	0,393	927	Triciclano
2	11,566	0,343	934	-pineno
3	12,291	0,031	951	Canfeno
4	13,549	0,049	977	-pineno

5	14,266	3,095	991	Mirceno
6	14,899	0,339	1004	Etil hexanoato

Cuadro 4. (continuación)

Nº pico	T. retención	% Área	IK e	Compuesto
7	15,424	1,141	1017	1,4-Cineole
8	15,982	10,509	1031	-Cimeno
9	16,257	0,142	1038	1,8Cineole
10	16,707	0,077	1048	Fenil acetaldehído
11	17,324	2,914	1062	-Terpineno
12	17,849	0,125	1073	-Cresol
13	18,349	0,087	1084	Terpinoleno
14	18,599	0,095	1089	Guaiacol
15	19,090	0,411	1099	Etil Heptanoato
16	24,290	0,862	1232	Citronolol
17	27,757	73,698	1329	Timol
18	28,906	0,882	1358	Eugenol
19	31,456	1,829	1425	ionone
20	31,740	0,072	1433	Cariofileno
21	32,031	0,061	1442	Erucin
22	32,248	0,746	1448	Acetona geranilo
23	32,765	1,136	1463	-cariofileno
24	33,59	0,242	1487	germacrenoD
25	31,631	0,284	1430	(E) -bergamotene
26	37,373	0,283	1587	Guaiol
27	38,248	0,155	1572	Oxido de Cariofileno

En la Cuadro 4 se observa que los componentes mayoritarios presentes en el aceite esencial de orégano utilizado en este estudio son en su orden: timol (73,698%), -cimeno (10,509%), mirceno (3,095%) y -terpineno (2,914%).

Como en la mayoría de los metabolitos secundarios presentes en las plantas, se ha demostrado que la composición de los compuestos del aceite esencial del orégano se ve afectada por las condiciones edafológicas y ambientales experimentadas durante el crecimiento de la planta, entre ellas las características del suelo, duración de la luz solar, temperatura, estrés de agua, etc., otro factor determinante en la composición de los metabolitos es la edad de la planta (Dos Santos *et al.*, 2004).

Las variaciones en la composición química de metabolitos secundarios en plantas de la misma especie, ha conducido a designar quimiotipos (*chemotypes*), así por ejemplo Castañeda *et al.*, (2007) estudiaron la composición química de los aceites esenciales de las hojas de 10 plantas aromáticas colombianas, entre ellas *L. organoides*, encontrando dos quimiotipos para el aceite esencial de esta especie. El quimiotipo A (típico) cuyos componentes mayoritarios fueron: carvacrol (36,6%), -cimeno (14,0%), -terpineno (13,3%), timol (9,1%), y -terpineno (3,8%); mientras que, para el quimiotipo B (atípico) los componentes mayoritarios fueron: -cimeno (15,7%), trans- β -cariofileno (9,4%), -felandreno + -3-careno (8,7%), limoneno (6,9%) y β -felandreno + eucaliptol (6,8%).

Celis *et al.*, (2007), realizaron un estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de *Lippia alba*, *Lippia organoides* y *phyla (Lippia) dulcis*, especies de la familia *Verbenaceae*, encontrando que el aceite de *Lippia organoides* estaba constituido principalmente por hidrocarburos monoterpénicos (37%) y monoterpénoides (56%), siendo timol (14,41%) y carvacrol (32,88%) los metabolitos más abundantes, junto con sus precursores biosintéticos *p*-cimeno (10,92%) y -terpineno (11,78%).

Oliveira *et al.* (2005), estudiaron la composición del aceite esencial de hojas de *Lippia organoides* HBK (procedentes del norte de Brasil) extraída por hidrodestilación, encontrando como componentes principales carvacrol (33,5-42,9%), -terpineno (8,0-10,5%), timol (5,1-8,4%), timol de metilo (6,1-8,7%) y -cimeno (11,9-15,8%).

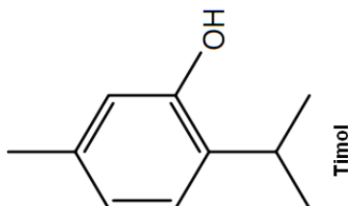
Los resultados obtenidos en este estudio en cuanto a la composición del aceite esencial del orégano silvestre del Alto Patía difieren de los quimiotipos reportados por Castañeda *et al.*, (2007) sin embargo coinciden con los reportados en el trabajo de Ruiz *et al.*, (2007), quienes analizaron los extractos de dos quimiotipos de *Lippia organoides*, encontrando como componentes mayoritarios en el quimiotipo reportado como quimiotipo II, timol (56,3%), -cimeno (11,8%) y -terpineno (7,3%).

Como se mencionó antes, estas diferencias en la composición química de los aceites esenciales están relacionadas con el estado y procedencia de la planta, las condiciones geobotánicas, y agrícolas de su cultivo, las condiciones climáticas, así como también variables en el proceso de extracción de los aceites.

Los compuestos fenólicos han sido foco de numerosos estudios por las actividades antioxidante y antibacteriana que demuestran tener, y se ha

encontrado que, dada su estructura química, el timol es más efectivo que el carvacrol (Celis *et al.*, 2007), lo que resalta el gran potencial de aprovechamiento industrial que podría tener el aceite esencial del orégano silvestre del Alto Patía, ya que su contenido de timol (73,69%) es mucho mayor que el encontrado en otros quimiotipos de la misma especie. En la Fig. 7 se presenta la estructura molecular del timol.

Figura 7. Estructura molecular de timol (Celis *et al.*, 2007).



6.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

6.2.1 Ensayo de DPPH•.

6.2.1.1 Ensayo DPPH• con aceite esencial de orégano *Lippia origanoides* Kunth. Se trabajó la muestra de aceite de orégano en las concentraciones descritas en la sección 5.3.1 de 12,5 – 200 $\mu\text{L/mL}$ y las muestras de ácido ascórbico, BHT y BHA en concentraciones de 0,0085 – 0,102 mM, para hacer las comparaciones respectivas. La razón por la cual se trabajaron los antioxidantes químicos en menores concentraciones que las del aceite en estudio es porque estos compuestos químicos se conocen por su naturaleza antioxidante y no se hace necesario comprobar su poder, sino que se usan como parámetros comparativos frente a la muestra de estudio para tener resultados concluyentes del aceite de orégano respecto a su actividad antioxidante.

Con el propósito de poder comparar los resultados de este trabajo con lo obtenidos en otros similares, se decidió estandarizar las unidades, por tanto, todas las concentraciones se trabajaron en mg/mL.

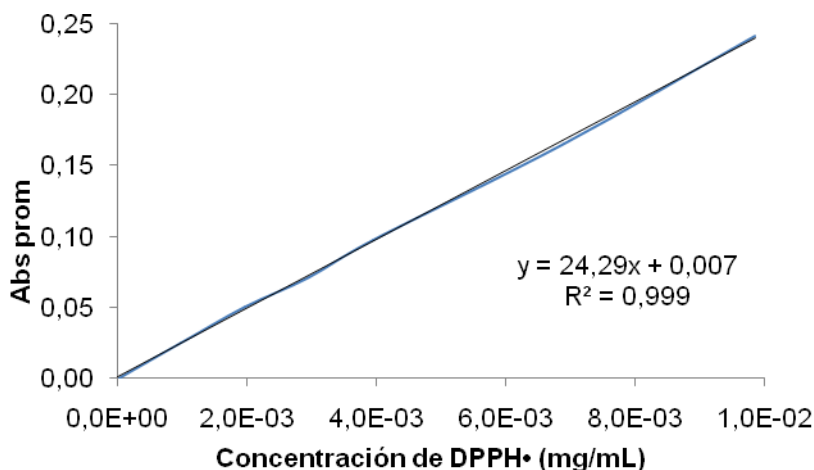
Se prepararon soluciones de DPPH• a diferentes concentraciones desde 0 hasta 0,025 mM y se midió la absorbancia de cada una de ellas a 516 nm en el espectrofotómetro. En la Fig. 8, se puede observar la representación de la absorbancia media de tres replicados frente a la concentración, éstos datos se muestran en la Cuadro 5; los resultados se ajustaron mediante el método de

mínimos cuadrados a una recta cuya ecuación se usó para obtener los valores de la concentración de DPPH•.

Cuadro 5. Valores de absorbancia para diferentes concentraciones de DPPH•.

$C_{\text{DPPH}\bullet}$ (mM)	$C_{\text{DPPH}\bullet}$ (mg/mL)	Abs (516nm)
0,0	0,0	0,0
0,0025	$9,858 \cdot E^{-4}$	0,0250
0,0050	$1,971 \cdot E^{-3}$	0,0505
0,0075	$2,957 \cdot E^{-3}$	0,0710
0,0100	$3,943 \cdot E^{-3}$	0,0976
0,0175	$6,900 \cdot E^{-3}$	0,1656
0,0250	$9,858 \cdot E^{-3}$	0,2416

Figura 8. Recta de calibración de DPPH•.



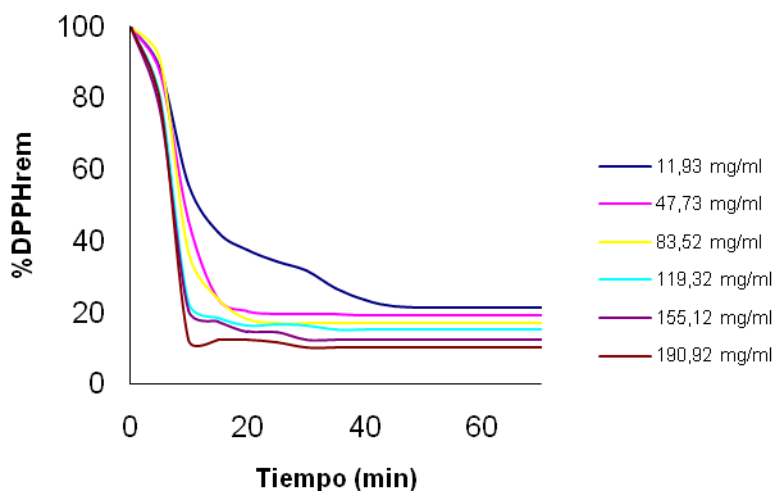
Para la corrección de la absorbancia se prepararon las muestras en las concentraciones mencionadas, se tomaron 3 mL de cada disolución y se hicieron reaccionar con 30 μL de aceite de orégano, a continuación se dispusieron en las cubetas del espectrofotómetro y se midió la absorbancia cada 5 minutos hasta la estabilización de la reacción. También se tomaron 3 mL de la solución de DPPH• y se midió la absorbancia cada 5 minutos del mismo modo que la muestra como control. Se observó que a lo largo del tiempo, la absorbancia inicial del DPPH• no se mantenía, sino que iba disminuyendo. Por esta razón a la absorbancia de las muestras a tiempo t se sumó la absorbancia perdida por el DPPH• control al mismo tiempo t .

La ecuación presentada en la Fig. 8, es la relación matemática entre el valor de absorbancia y la concentración de DPPH• en el medio, con esto se logró determinar por extrapolación el valor de la concentración de DPPH• (mg/mL) a cualquier valor de absorbancia leído para la muestra evaluada. Entonces se tiene la ecuación de calibración de DPPH•: $Abs_{516nm}=24,298 \cdot C_{DPPH\bullet}+0,007$ (8)

La muestra se preparó en diferentes concentraciones 12.5, 50, 87.5, 125, 162.5 y 200 $\mu\text{L/mL}$; estos valores se transformaron a mg/mL. Para ello se determinó la densidad del aceite de orégano por picnometría, siendo el promedio de tres mediciones igual a 0,9546 g/mL; entonces las concentraciones anteriores corresponden a: 11.93, 47.73, 83.52, 119.32, 155.12 y 190.91 mg/mL. (ANEXO A).

Para determinar la cinética de reacción del aceite esencial de orégano se tomó el valor promedio de la absorbancia de tres ensayos, se corrigió con el valor de la pérdida de absorbancia del control y los resultados se extrapolaron en la recta de calibración de DPPH•, entonces se obtuvo la concentración de DPPH• en cada tiempo $C_{DPPH\bullet (t=t)}$. Posteriormente, aplicando la ecuación (4) se obtuvo el porcentaje de DPPH• remanente (%DPPH• rem) el cual se graficó contra el tiempo para cada una de las concentraciones, para obtener la cinética de la reacción, como se muestra en la siguiente Fig. 9.

Figura 9. Porcentaje de DPPH• remanente respecto al tiempo para diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano.



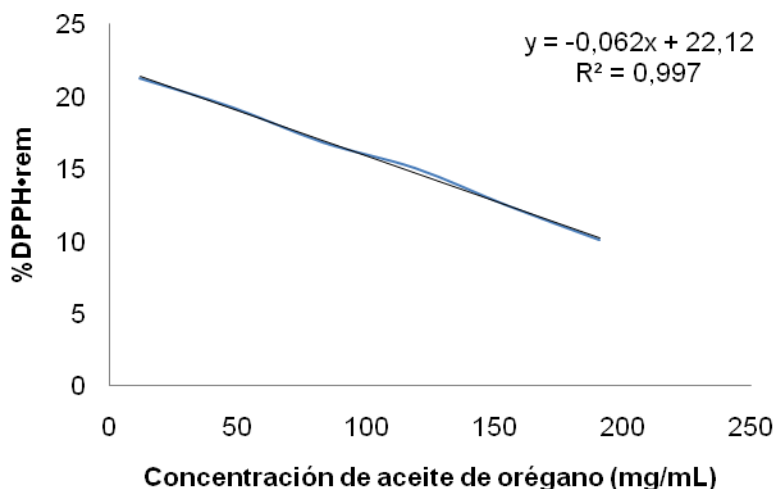
En la Fig. 9 se observa que el aceite de orégano presenta gran actividad antioxidante en los primeros 10 minutos de reacción y que alcanza a estabilizarse entre los 15 y 20 minutos en las muestras mas concentradas y entre los 30 y 40 minutos en las muestras menos concentradas; para todas las concentraciones se aprecia que aproximadamente a los 45 minutos la reacción se ha estabilizado, por tanto, se eligió este tiempo como punto final de la reacción, es decir, como tiempo estacionario.

El porcentaje de radicales libres DPPH• remanentes a los 45 minutos para cada una de las concentraciones de aceite esencial probadas, (Cuadro 6) fue transferido a un gráfico de porcentaje de DPPH• remanente en el medio de reacción en función de la concertación del aceite en tiempo estacionario, como se muestra en la Fig. 10.

Cuadro 6. Porcentaje de DPPH• remanente a diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano.

Concentración mg/mL	% DPPH•rem
11,9	21,24
47,7	19,26
83,5	16,81
119,3	15,61
155,1	12,46
190,9	10,09

Figura 10. Porcentaje de DPPH• remanente en función de las concentraciones de aceite de orégano evaluadas.



En la Fig. 10 se observa que la disminución del porcentaje DPPH• remanente sigue una tendencia lineal, y por regresión por mínimos cuadrados se obtiene una recta cuya ecuación es: $\%DPPH\bullet_{rem} = -0,062 \cdot C_{AEO} + 22,12$ ($R^2=0.997$), con la concentración aceite de orégano expresada en mg/mL. De la ecuación de la curva, se obtiene el valor EC_{50} , el cual es la concentración de aceite de orégano que corresponde con el 50% DPPH• remanente, sin embargo, para este caso, matemáticamente y gráficamente no se pudo encontrar debido a que las concentraciones de aceite de orégano empleadas mostraron una actividad antioxidante tan poderosa que, en todos los casos, el porcentaje de DPPH• remanente fue menor al 25%, haciendo imposible encontrar el valor EC_{50} dentro del intervalo de concentraciones probadas experimentalmente.

Se podría afirmar que la EC_{50} para el aceite esencial de orégano silvestre del Alto Patía, es decir, la cantidad de aceite esencial necesaria para reducir la concentración inicial de radical libre DPPH• en un 50%, es inferior a 11,9 mg/mL.

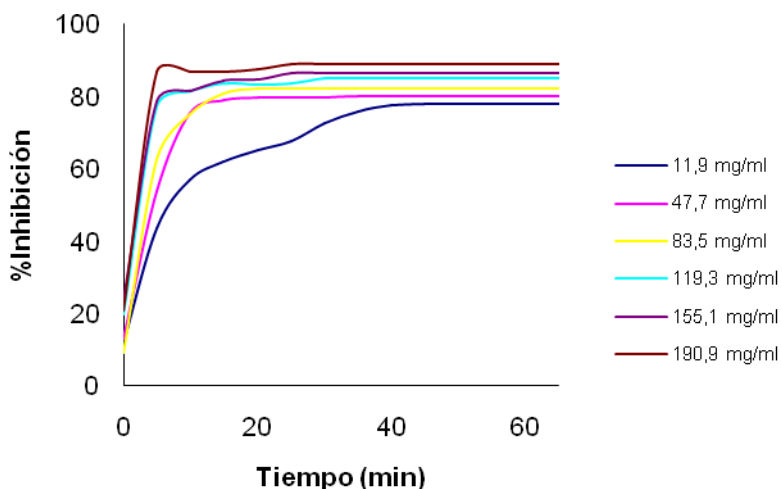
Esta actividad antioxidante se refleja en el cambio de color del violeta que presenta el DPPH• al amarillo que representa la acción del antioxidante sobre el radical libre; en el ensayo del aceite, este suceso, fue evidente y proporcional a la concentración de la muestra como se muestra en la Fig. 11.

Figura 11. Cambio colorimétrico del DPPH•, a diferentes concentraciones de aceite de orégano.



Trabajando con los mismos valores de absorbancia que permitieron elaborar la Fig. 9 y Fig. 10, se elaboró también la figura de porcentaje de inhibición, según la ecuación (5) como se muestra a continuación.

Figura 12. Porcentaje de inhibición con relación al tiempo para diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano.



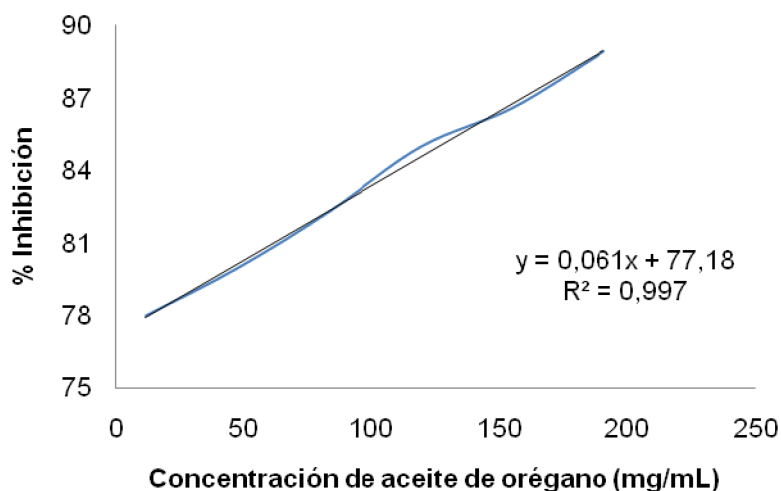
La Fig. 12 muestra que se logra mayor capacidad de inhibición en las concentraciones de AEO más elevadas. Entonces, según la Fig. 9 y Fig. 12 a mayor concentración de aceite de orégano menor porcentaje de DPPH• remanente y mayor porcentaje de inhibición; en las concentraciones más bajas hay menor porcentaje de inhibición y la reacción tarda entre 5 y 15 minutos más que en las reacciones con mayor concentración de AEO; no obstante, se alcanzan buenos porcentajes de inhibición.

La inhibición de radicales libres DPPH• con las concentraciones de AEO evaluadas (11,9 a 190,9 mg/mL) alcanzó porcentajes entre 77,9% y 88,9%, en tiempo estacionario, como se muestra con mayor claridad en la Cuadro 7 y la Fig. 13.

Cuadro 7. Porcentaje de inhibición a diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano en el tiempo estacionario.

Concentración mg/mL	% I _{Ts}
11,9	77,965
47,7	79,944
83,5	82,292
119,3	84,393
155,1	86,572
190,9	88,915

Figura 13. Porcentaje de inhibición de radicales DPPH• con relación a la concentración de aceite esencial de orégano.

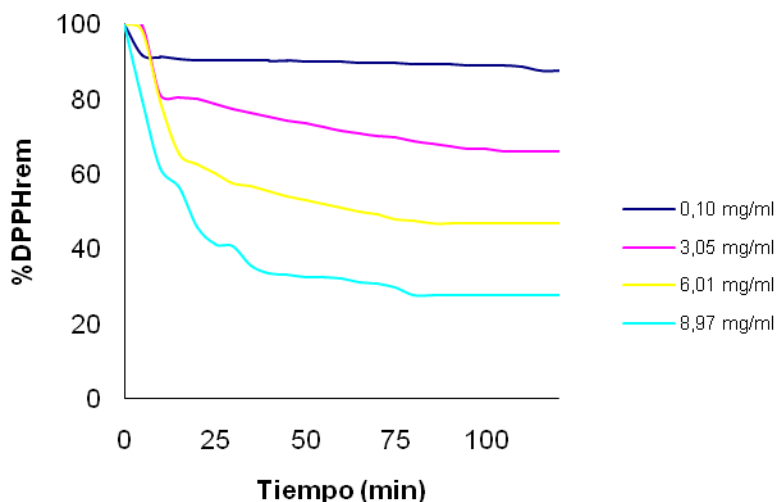


De la misma manera como sucedió con la Fig. 10 de porcentaje de DPPH• remanente vs concentración AEO, donde no se pudo determinar el parámetro EC₅₀, tampoco fue posible determinar la IC₅₀, ya que la ecuación de la gráfica no permitieron ubicar estos valores. Por tanto, se tomó la decisión de realizar nuevos ensayos utilizando concentraciones menores de aceite de orégano, para poder determinar la EC₅₀ y la IC₅₀.

Las nuevas concentraciones de aceite esencial evaluadas fueron 0.1, 3.2, 6.3 y 9.4 µL/mL, que corresponden a 0.1, 3.05, 6.01 y 8.97 mg/mL, se siguió la misma metodología descrita en la sección 5.3.1, se midieron las absorbancias obtenidas de las concentraciones del nuevo intervalo (ANEXO B), luego usando la ecuación

8 se obtuvieron las concentraciones de DPPH• en el medio y, por último, usando la ecuación 4 que da el valor de porcentaje de DPPH• remanente, se construyeron las siguientes gráficas y cuadros:

Figura 14. Segunda prueba porcentaje de DPPH• remanente respecto al tiempo para diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano.



La Fig. 14 muestra una reactividad más lenta y un descenso no tan marcado en comparación con el primer intervalo de concentraciones de aceite de orégano evaluado (Fig. 9), no obstante, se aprecia como al aumentar la concentración del aceite se consigue una mayor disminución de los radicales DPPH•.

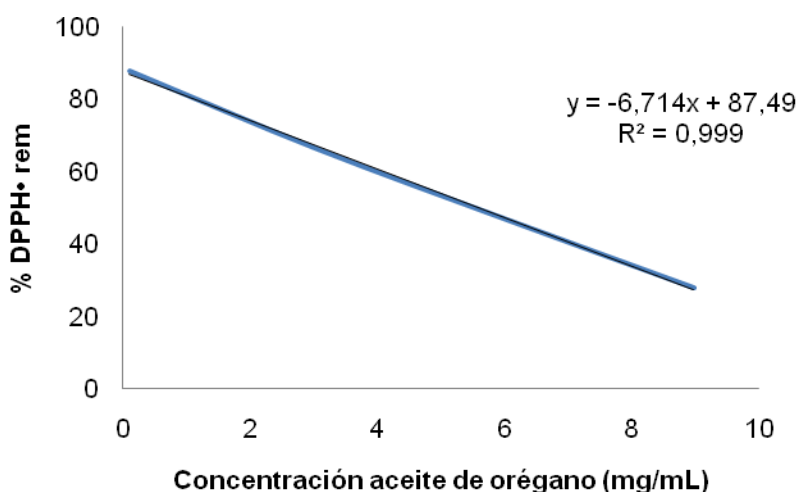
El tiempo estacionario promedio para las reacciones de DPPH• con cada una de las concentraciones de aceite de orégano que describe en ésta gráfica, se encuentra entre el intervalo de 90-120 minutos, haciendo un promedio de 105 minutos para éstas concentraciones. Se observa que la disminución de radical libre DPPH• en los primeros 30 minutos de la reacción es significativo, y luego se lentifica tomando una tendencia casi lineal hasta que finalmente se estabiliza.

Los valores de porcentaje de DPPH• remanente a diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano se presentan en la Cuadro 8.

Cuadro 8. Segunda prueba porcentaje de DPPH• remanente a diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano.

Concentración mg/mL	% DPPH•rem
0,1	87,59
3,1	66,07
6,0	46,73
9,0	27,81

Figura 15. Segunda prueba porcentaje de DPPH• remanente con relación a la concentración de aceite esencial de orégano.



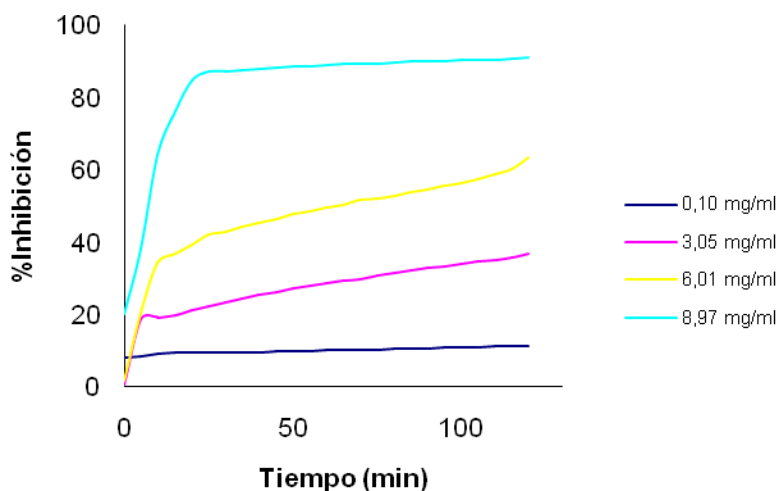
Como se observa en la Fig. 15 se obtuvo una correlación lineal inversa para porcentaje de DPPH• remanente con relación a la concentración de aceite esencial, con un coeficiente de determinación de 0,999. La ecuación para dicha correlación obtenida por el método de los mínimos cuadrados es: $\%DPPH\bullet rem = -6,714 \cdot C_{AEO} + 87,49$ ($R^2=0,999$). La concentración aceite de orégano en la anterior ecuación está dada en mg/mL y con ella se obtiene que el valor EC_{50} es $5,58 \pm 0,035$ mg AEO/mL DPPH•.

Usando los mismos valores de absorbancia para estas nuevas concentraciones y aplicando la ecuación 5, se calcularon los porcentajes de inhibición que se presentan en la Cuadro 9 y en la Fig. 16.

Cuadro 9. Segunda prueba porcentaje de Inhibición a diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano en el tiempo estacionario.

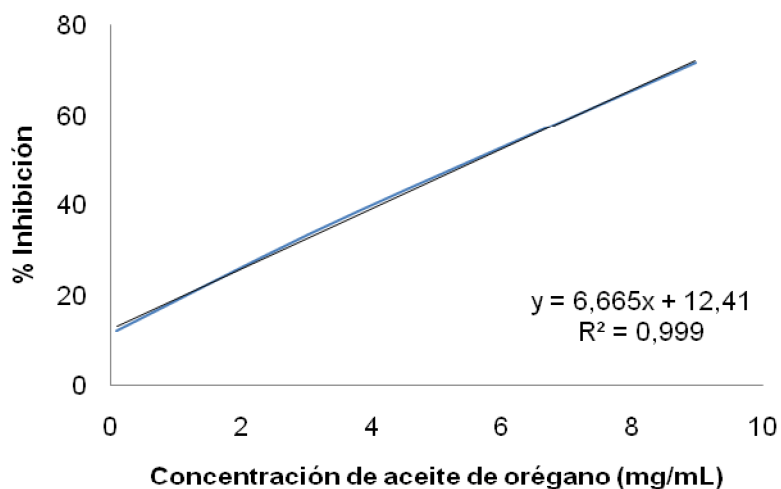
Concentración mg/mL	% I _{Ts}
0,1	12,3173
3,1	33,6842
6,0	52,8796
9,0	71,6667

Figura 16. Segunda prueba porcentaje de inhibición frente al tiempo para diferentes concentraciones de aceite de orégano.



Según la Fig. 16, en el intervalo de concentraciones evaluadas no se alcanza un porcentaje de inhibición mayor al 80%, significa que la actividad antioxidante es menos poderosa que en las concentraciones mayores y esto se coteja en la Cuadro 9 y Fig. 16.

Figura 17. Segunda prueba porcentaje de inhibición respecto a la concentración de aceite esencial de orégano.



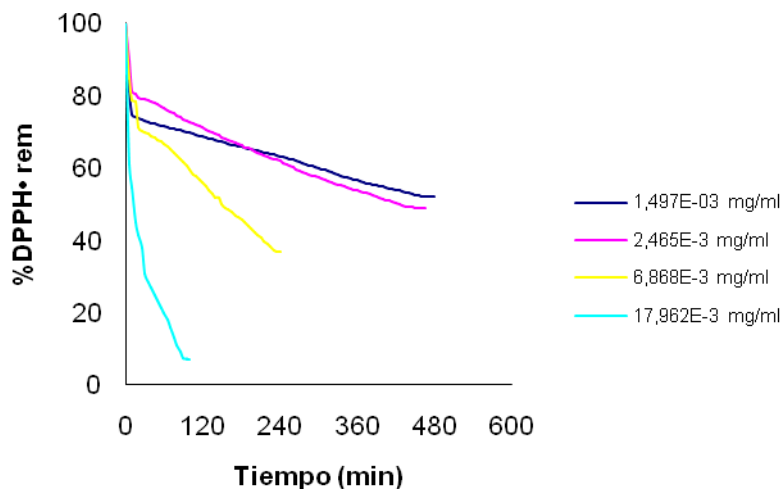
De la Cuadro 9 se tiene que con una concentración de 9000 ppm de AEO se logró un porcentaje de inhibición de 71,67% de radicales DPPH• en el medio; según la ecuación de la curva $\%I = 6,665 \cdot C_{AEO} + 12,41$ ($R^2=0,999$), el valor IC_{50} que es la concentración de AEO que inhibe el 50% de radicales libres es de $5,64 \pm 0,035$ mg AEO/mL DPPH• o sea 5640 ppm.

6.2.1.2 Evaluación de la capacidad de captura radical DPPH• de los antioxidantes convencionales ácido ascórbico, BHT y BHA y comparación con la del aceite esencial *Lippia organoides* Kunth. Para el desarrollo de esta parte de la investigación se siguió la metodología propuesta por Cavero (2003), con el fin de que los resultados fueran comparables.

Las muestras de los patrones (ácido ascórbico, BHA y BHT) se prepararon en las siguientes concentraciones: 0.0085, 0.014, 0.039 y 0.102 mM y se convirtieron a mg/mL según el peso de cada patrón. Siguiendo el mismo protocolo empleado para el aceite esencial se construyeron las gráficas y cuadros correspondientes.

6.2.1.2.1 Ensayo de DPPH• con ácido ascórbico. Los resultados de las medidas de absorbancia tomadas durante 8 horas para el ensayo con el ácido ascórbico se describen con detalle en el ANEXO C, en la Fig. 18 se muestran las curvas para porcentaje de DPPH• remanente en función del tiempo para diferentes concentraciones de ácido ascórbico.

Figura 18. Porcentaje de DPPH• remanente frente al tiempo para diferentes concentraciones de ácido ascórbico (mg/mL).



La Fig. 18 muestra que el ácido ascórbico reacciona entre los primeros 30 y 40 minutos de una manera veloz y en los siguientes minutos desciende de una manera lenta y constante hasta que finalmente se estabiliza.

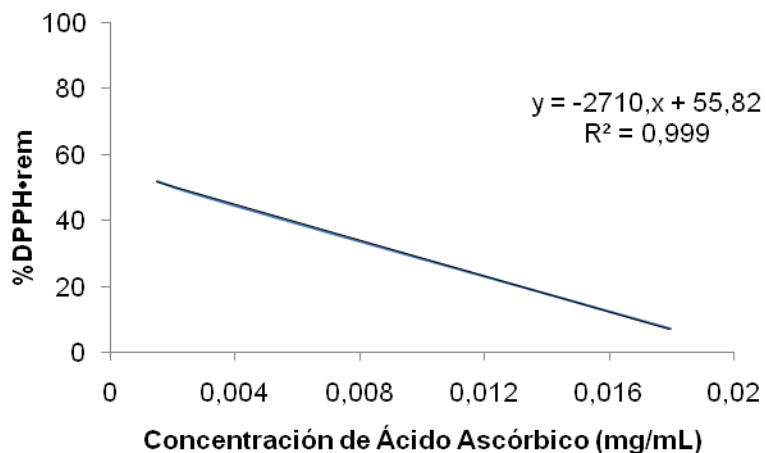
En la concentración más alta ($17,962 \cdot 10^{-3}$ mg/mL) el ácido ascórbico tarda menos de 2 horas en completar la reacción con los radicales de DPPH•, mientras que las concentraciones más bajas superaron las 8 horas de reacción.

En la Cuadro 10 se presenta el porcentaje de DPPH• remanente para diferentes concentraciones de ácido ascórbico.

Cuadro 10. Porcentaje de DPPH• remanente a diferentes concentraciones de ácido ascórbico.

Concentración mM	Concentración mg/mL	%DPPH•rem
0,0085	$1,497 \cdot 10^{-3}$	52,11
0,014	$2,465 \cdot 10^{-3}$	48,97
0,039	$6,868 \cdot 10^{-3}$	36,95
0,102	$17,962 \cdot 10^{-3}$	7,23

Figura 19. Porcentaje de DPPH• remanente frente a las concentraciones de ácido ascórbico evaluadas (mg/mL).



Con la ecuación de la Fig. 19 se obtuvo que el valor EC_{50} para el ácido ascórbico es $2,147 \cdot 10^{-3} \pm 0,024$ mg AEO/mL DDPH•, el cual es semejante al encontrado por Cavero (2003), quien obtuvo en su estudio un valor de EC_{50} para éste antioxidante de $2,28 \cdot 10^{-3}$ mg/mL. Esta semejanza de resultados comprueba que la metodología fue aplicada correctamente.

Cabe anotar, que el método utilizado por Cavero está basado en Brand-Williams *et al.*, (1995) (Cavero, 2003) con modificaciones.

En la Cuadro 11 y las Fig. 20 y 21 se presentan los resultados de porcentaje de inhibición para el ácido ascórbico.

Cuadro 11. Porcentaje de inhibición a diferentes concentraciones de ácido ascórbico en el tiempo estacionario.

Concentración mM	Concentración mg/mL	% I _{Ts}
0,0085	$1,497 \cdot 10^{-3}$	47,846
0,014	$2,465 \cdot 10^{-3}$	50,977
0,039	$6,868 \cdot 10^{-3}$	62,989
0,102	$17,962 \cdot 10^{-3}$	92,665

Figura 20. Porcentaje de inhibición frente al tiempo para diferentes concentraciones de ácido ascórbico (mg/mL).

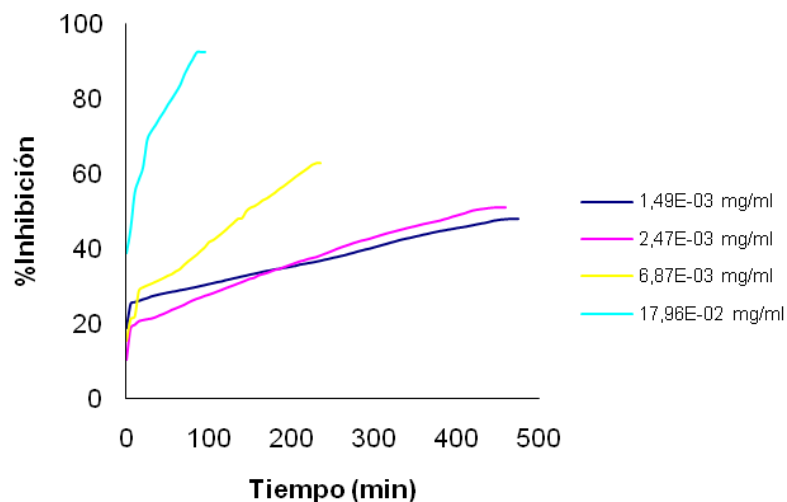
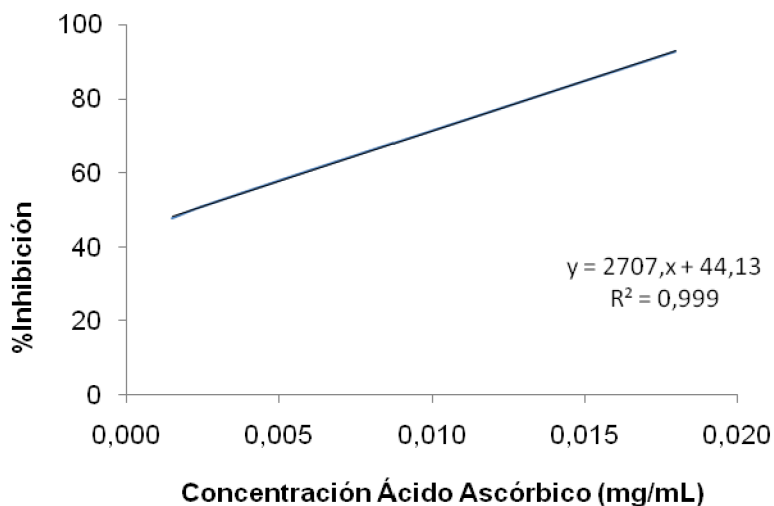


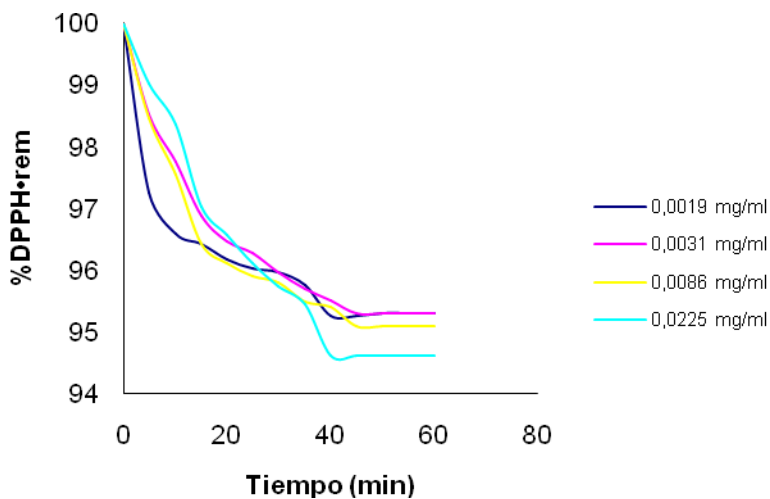
Figura 21. Porcentaje de inhibición para las concentraciones de ácido ascórbico evaluadas (mg/mL).



Con la ecuación de la Fig. 21, se obtuvo que el valor IC_{50} para el ácido ascórbico es $2,17 \cdot 10^{-3} \pm 0,024$ mg AEO/mL DDPH•; esto significa un alto poder antioxidante.

6.2.1.2.2 Ensayo de DPPH• con BHT. Los resultados de las medidas de absorbancia tomadas durante 60 minutos para el ensayo con el antioxidante convencional BHT se describen con detalle en el ANEXO D.

Figura 22. Porcentaje de DPPH• remanente respecto al tiempo para diferentes concentraciones de BHT (mg/mL).



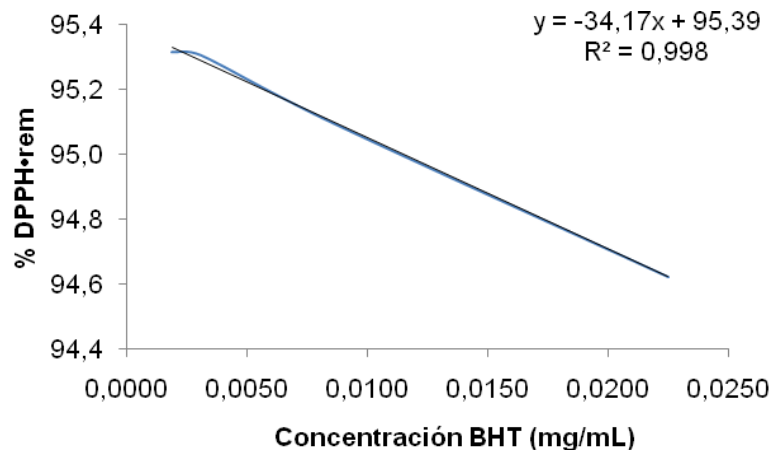
La Fig. 22 muestra que los porcentajes de DPPH• remanente obtenidos para todas las concentraciones superan el 90%, esto significa que el BHT en el intervalo de concentraciones trabajado no tiene una buena actividad antioxidante.

La Cuadro 12 referencia los porcentajes de inhibición que alcanza cada concentración de DPPH• cuando se ha estabilizado la reacción.

Cuadro 12. Porcentaje de DPPH• remanente a diferentes concentraciones de BHT.

Concentración mM	Concentración mg/mL	% DPPH•rem
0,0085	0,0019	95,3123
0,014	0,0031	95,3028
0,039	0,0086	95,0935
0,102	0,0225	94,6226

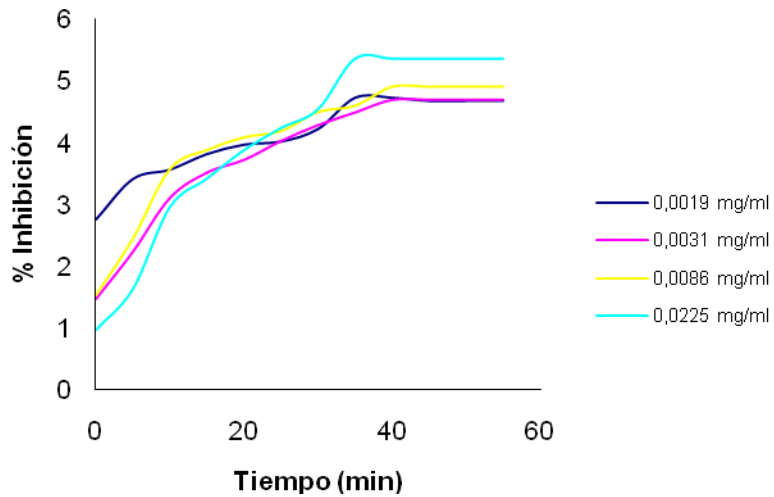
Figura 23. Porcentaje de DPPH• remanente frente a las concentraciones de BHT evaluadas (mg/mL).



Con la ecuación mostrada en la Fig. 23 se calculó el EC_{50} para el BHT = $1,328 \pm 0,029$ mg AEO/mL DPPH•.

Los datos registrados de absorbancia también permitieron calcular el porcentaje de inhibición para el BHT.

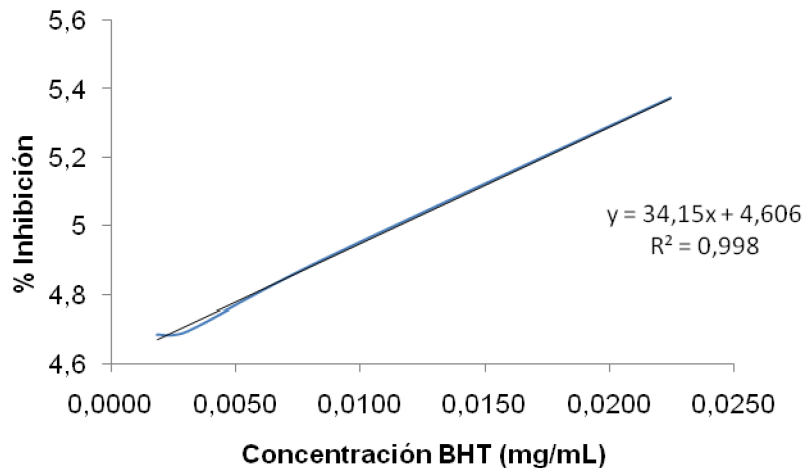
Figura 24. Porcentaje de inhibición frente al tiempo para diferentes concentraciones de BHT (mg/mL).



Cuadro 13. Porcentaje de Inhibición para diferentes concentraciones de BHT.

Concentración mM	Concentración mg/mL	% I _{Ts}
0,0085	0,0019	4,684
0,014	0,0031	4,694
0,039	0,0086	4,903
0,102	0,0225	5,3736

Figura 25. Porcentaje de inhibición para diferentes concentraciones de BHT (mg/mL).

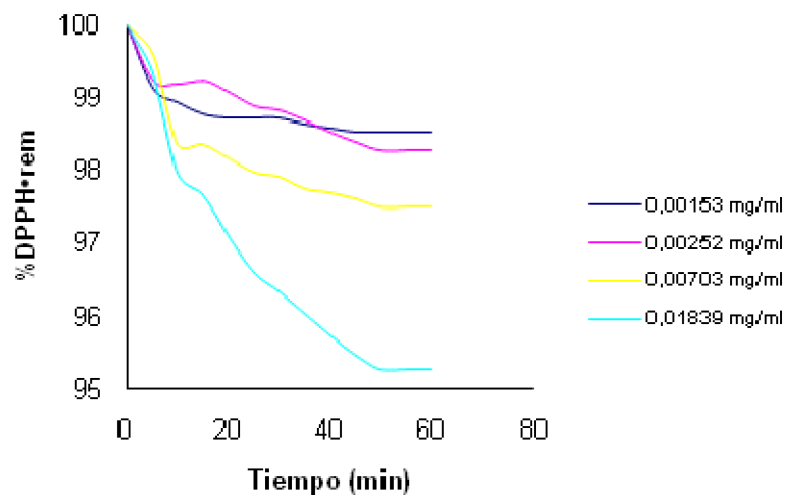


La ecuación presentada en la Fig. 25 permitió calcular un $IC_{50} = 1,329 \pm 0,029$ mg AEO/mL DPPH•, este efecto de inhibición es inferior al presentado por el aceite de orégano y el ácido ascórbico.

6.2.1.2.3 Ensayo de DPPH• con BHA. Los resultados de las medidas de absorbancia tomadas durante 60 minutos para el ensayo con el antioxidante convencional BHA se describen con detalle en el ANEXO E.

En las Fig. 26 y 27 y la Cuadro 14 se muestran los resultados de los análisis de porcentajes de DPPH• remanente para el BHA (mg/mL).

Figura 26. Porcentaje de DPPH• remanente respecto al tiempo para diferentes concentraciones de BHA (mg/mL).

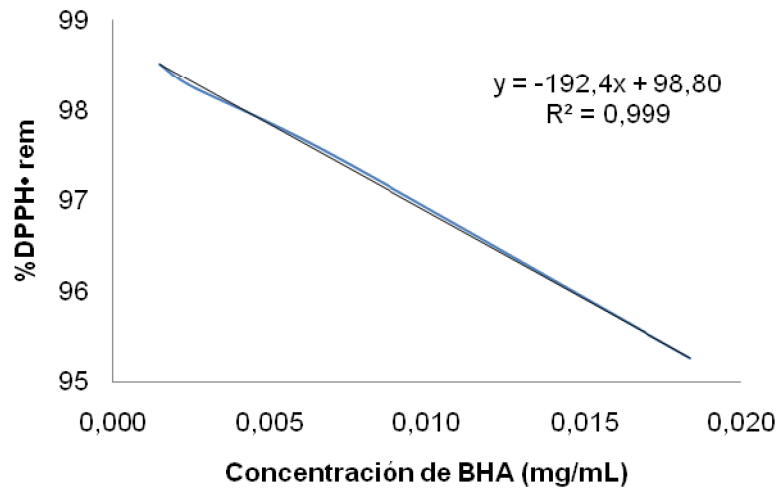


La forma como reacciona el DPPH• frente al BHA es semejante a la del BHT en cuanto al porcentaje de DPPH• remanente que deja en el medio y el tiempo que tarda en reaccionar.

Cuadro 14. Porcentaje de DPPH• remanente a diferentes concentraciones BHA.

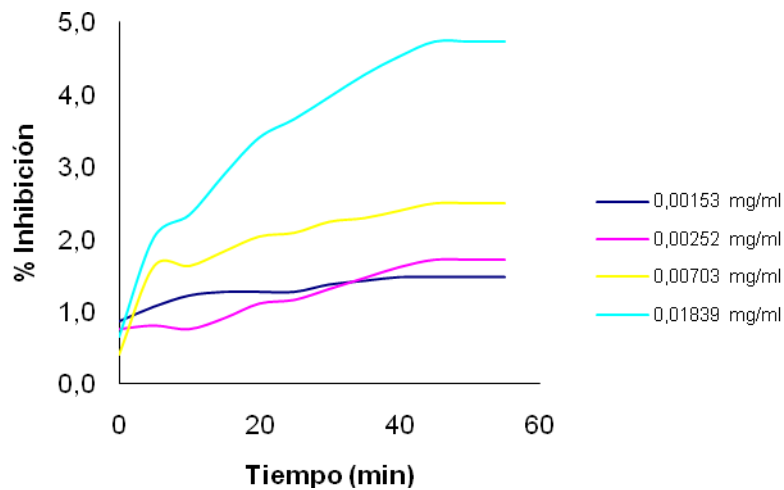
Concentración mM	Concentración mg/mL	% DPPH•rem
0,0085	0,00153	98,5224
0,014	0,00252	98,2711
0,039	0,00703	97,5008
0,102	0,01839	95,2541

Figura 27. Porcentaje de DPPH• remanente con relación a las concentraciones de BHA evaluadas (mg/mL).



Con la ecuación de la Fig. 27 se calculó que la EC_{50} del BHA es $0,254 \pm 3,24 \cdot 10^{-3}$ mg AEO/mL DPPH•.

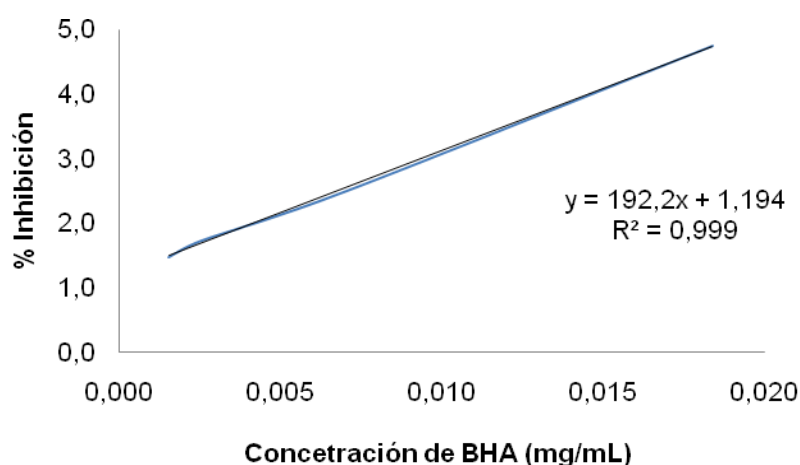
Figura 28. Porcentaje de inhibición frente al tiempo para diferentes concentraciones de BHA (mg/mL).



Cuadro 15. Porcentaje de Inhibición a diferentes concentraciones de BHA.

Concentración mM	Concentración mg/mL	% I _{Ts}
0,0085	0,00153	1,476
0,014	0,00252	1,727
0,039	0,00703	2,497
0,102	0,01839	4,742

Figura 29. Porcentaje de inhibición respecto a la concentración de BHA (mg/mL). Se obtuvo que el valor IC₅₀ para el BHA es $0,254 \pm 3,24 \cdot 10^{-3}$ mg AEO/mL DPPH•.



En la Cuadro 16 se presenta la comparación de la capacidad de captura de radicales DPPH• del aceite esencial de orégano con respecto a los antioxidantes convencionales ácido ascórbico, BHT y BHA.

Cuadro 16. Comparación de la actividad antioxidante del aceite de orégano frente al ácido ascórbico, BHT y BHA.

Patrón	C _{patrón} mM	C _{patrón} (mg/mL)	%DPPH• rem _{Ts}	Ts (min)	EC ₅₀ (mg SE/mL DPPH•)	%I _{Ts}	IC ₅₀ (mg SE/mL DPPH•)
AEO	-	11,9	21,24	60	< 11,9	77,96	< 11,9
	-	47,7	19,26	50		79,94	
	-	83,5	16,81	45		82,29	
	-	119,3	15,61	45		84,39	
	-	155,1	12,46	45		86,57	
	-	190,9	10,09	45		88,92	

Cuadro 16. (Continuación)

Patrón	C _{patrón} mM	C _{patrón} (mg/mL)	%DPPH• rem _{Ts}	Ts (min)	EC ₅₀ (mg SE/mL DPPH•)	%I _{Ts}	IC ₅₀ (mg SE/mL DPPH•)
AEO	-	0,1	87,59	125	5,583	12,32	5,64
	-	3,1	66,07	115		33,68	
	-	6,0	46,73	95		52,88	
	-	9,0	27,81	90		71,67	
Ácido Ascórbico	0,0085	0,0014	52,11	480	2,15*10 ⁻³	47,85	2,16*10 ⁻³
	0,014	0,0024	48,97	465		50,98	
	0,039	0,0068	36,95	240	2,28*10 ⁻³ *	62,99	
	0,102	0,0179	7,23	100		92,66	
BHT	0,0085	0,0019	95,31	60	1,328	4,68	1,293
	0,014	0,0031	95,30	55		4,69	
	0,039	0,0086	95,09	55		4,90	
	0,102	0,0225	94,62	50		5,37	
BHA	0,0085	0,0015	98,52	55	0,254	1,48	0,254
	0,014	0,0025	98,27	60		1,73	
	0,039	0,0070	97,50	60		2,49	
	0,102	0,0184	95,25	60		4,74	

(Cavero, 2003)

Los valores de EC₅₀ obtenidos en orden descendente fueron: ácido ascórbico > BHA > BHT > AEO. El valor EC₅₀ para el aceite de orégano es semejante a los convencionales BHT y BHA y eso es destacable. Comparando con otros aceites, Carhuapoma, *et al.*, evaluaron que la actividad antioxidante del aceite esencial de arrayán que presentó un IC₅₀ de 43,35µg/mL frente al ácido ascórbico con un IC₅₀ de 36,41µg/mL (Carhuapoma *et al.*, 2005).

En otro estudio se demuestra la superioridad de actividad antioxidante del aceite esencial de *L. origanoides* Kunth con un EC₅₀= 6,0 mg AO/mg DPPH• frente a otros aceites esenciales como el de *Lippia alba* (quimiotipo carvona), *Lippia alba* (quimiotipo citral) y *Phyla dulcis* que dieron valores de EC₅₀ de 289, 305 y 8,47 mg AO/mg DPPH• respectivamente; sin embargo, no supera los antioxidantes convencionales, la vitamina E tuvo un EC₅₀ de 0,25 mg AO/mg DPPH• y el trolox de 0,278 mg AO/mg DPPH• (Celis *et al.*, 2007).

En la universidad de Guanajuato, se realizó una investigación acerca de la actividad antioxidante del aceite de orégano *Poliomintha longiflora* Gray, comparado con el ácido ascórbico; sus resultados muestran un EC₅₀ para la vitamina C de 5,495 µg/mL, y para el aceite de orégano de 0,001µg/mL, éstos

resultados expresan que el aceite a menor concentración tiene mayor poder antioxidante que el ácido ascórbico (Delgado *et al.*, 2010).

En el estudio de la actividad antioxidante del aceite de *Piper auritum* Kunth, se encontró que el valor EC₅₀ fue 348 µg/mL, mientras que para la vitamina E fue de 0,27 µg/mL (Gracia, *et al.*, 2007).

La diversidad de resultados respecto a los mismos patrones, se debe no solo a las unidades de valoración, sino también a la metodología, la pureza de los componentes y el intervalo de concentración trabajado. Por tanto, es complejo comparar los resultados de una investigación con otra, ya que no se evalúa con un método estándar.

En éste caso, hay que tener en cuenta que el intervalo de concentraciones utilizado influye en el valor EC₅₀, es decir, si se trabaja en un intervalo mayor de concentraciones el EC₅₀ también será mayor, de la misma manera, si se trabaja en un intervalo menor de concentraciones el EC₅₀ se ubicará en la mitad de la curva que resulte. Ahora, teniendo presente que el aceite de orégano se trabajó en un intervalo de 0,1 - 8,9 mg/mL y los patrones en un intervalo de 0,0085 - 0,102 mM, es decir, en concentraciones menores a 0,025 mg/mL; el valor EC₅₀ que surge de la ecuación de la gráfica que representa la reacción para cada caso se coteja con el valor que resulta al reemplazar la concentración de la muestra por 5 ppm, es decir, se busca no el porcentaje 50 sino el efecto de 5 ppm de cada patrón en la ecuación que le corresponde, tanto en porcentajes de DPPH• remanente como en los respectivos porcentajes de inhibición.

El resultado de éste análisis se muestra en la Cuadro 17.

Cuadro 17. Comparación de la actividad antioxidante del aceite esencial de orégano frente a otros antioxidantes convencionales.

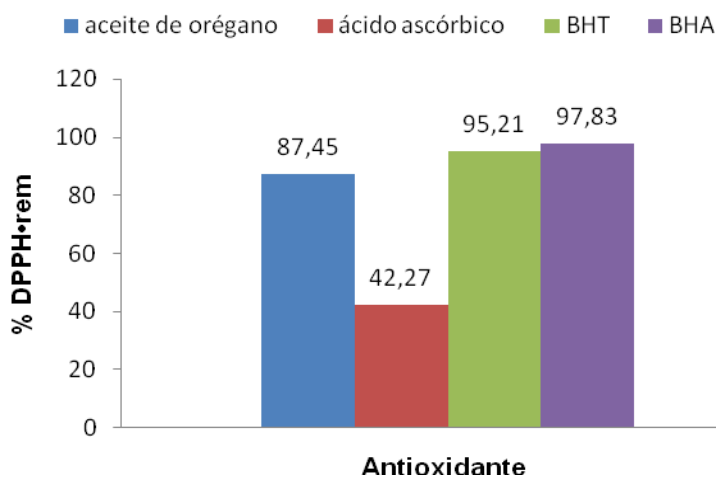
Patrón	Efecto de 5 ppm		EC ₅₀ (mg/mL)
	% DPPH• rem	% Inhibición	
AEO	87,45	12,44	5,583
Ac. Ascórbico	42,27	57,66	2,14*10 ⁻³
BHT	95,21	4,77	1,328
BHA	97,83	2,16	0,254

Desde el punto de vista del efecto de 5 ppm, la Cuadro 17 muestra que el porcentaje de DPPH• y su contraparte el porcentaje de inhibición, tiene los

mejores resultados en el siguiente orden: ácido ascórbico > aceite de orégano > BHT > BHA.

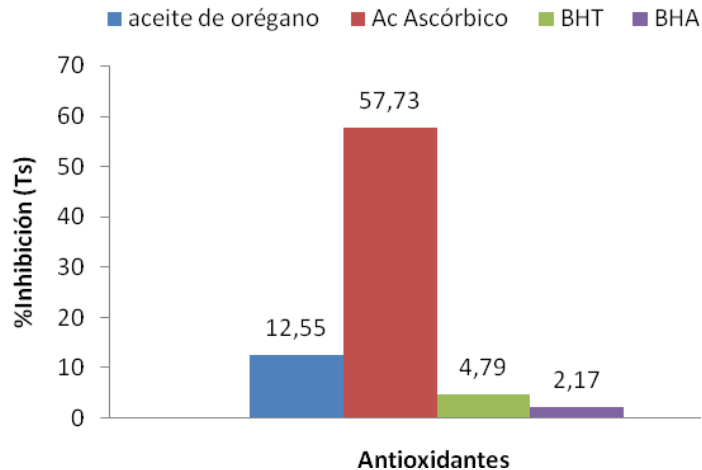
Lo anterior concuerda con la comparación de la Fig. 14 que es la representación de porcentaje de DPPH• remanente frente al tiempo en diferentes concentraciones de aceite de orégano con sus homologas en BHT y BHA que son la Fig. 22 y Fig. 28 respectivamente; allí se evidencia que la decoloración de DPPH• es mucho más rápida en el aceite de orégano que en los patrones de BHT y BHA. La figura siguiente muestra con claridad el porcentaje de DPPH• remanente que se obtiene con las 5 ppm.

Figura 30. Comparación de la actividad antioxidante del aceite esencial de orégano frente a otros antioxidantes convencionales (efecto de 5 ppm).



Un análisis similar al anterior, pero esta vez con referencia al porcentaje de inhibición de DPPH• en el tiempo de estabilización de cada reacción se muestra en la Fig. 31.

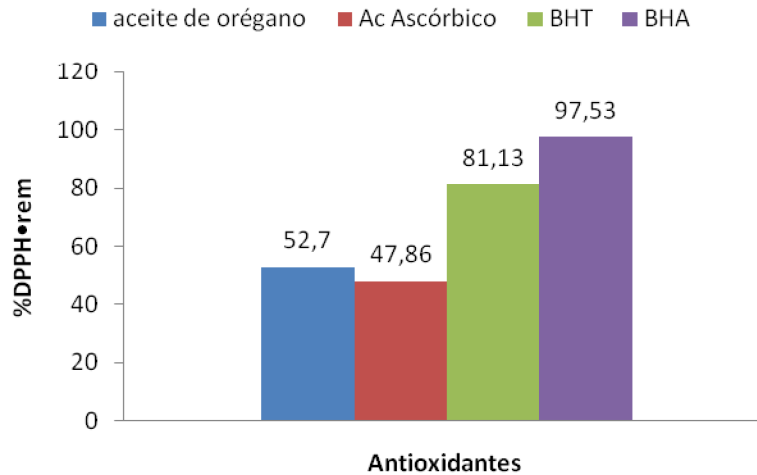
Figura 31. Comparación de la actividad antioxidante del aceite esencial de orégano frente a otros antioxidantes convencionales medida en porcentaje de inhibición.



La actividad antioxidante del AEO comparada con la de otros antioxidantes convencionales medida en porcentaje de inhibición de radicales DPPH• es en su orden: ácido ascórbico > aceite de orégano > BHT > BHA. El aceite de orégano y el ácido ascórbico inhiben más del 70% de radicales DPPH• en la concentración más alta evaluada en este trabajo, mientras que el BHT y el BHA, no superan el 6% de inhibición del radical en la concentración más alta evaluada; esto ubica al aceite de orégano como un antioxidante natural muy promisorio.

Teniendo en cuenta lo anterior con respecto al tiempo de reacción y al tiempo de estabilización de las diferentes muestras, se toma un tiempo estándar de 20 minutos como ejemplo para evidenciar el comportamiento de la muestra de mayor concentración de cada antioxidante frente al porcentaje de DPPH• remanente.

Figura 32. Comparación de la actividad antioxidante del aceite esencial de orégano frente a otros antioxidantes convencionales medida en porcentaje de inhibición (tiempo 20min).



Al realizar la comparación con el tiempo se encuentra el mismo orden en el efecto de la reacción lo cual confirma que el efecto del AEO es superado únicamente por el ácido ascórbico mas no por el BHT y BHA.

6.2.2. Ensayo ABTS•+.

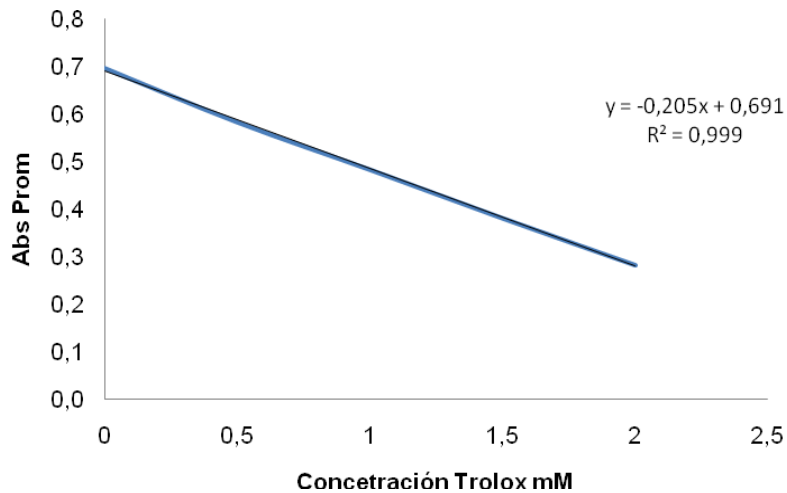
Se realizó una curva de calibrado con soluciones de concentración conocida del patrón Trolox (homólogo de la vitamina E), para ello se tomaron 2 mL de la solución de ABTS•+ con una absorbancia inicial de $0,700 \pm 0,5$ y se agregaron 20 μL de cada concentración de Trolox (0 – 2 mM), se agitó durante un minuto y se dejó en reposo 6 minutos, pasado este tiempo se midió la absorbancia a 734 nm, cada ensayo se lo realizó por triplicado.

Con los datos obtenidos se definió la siguiente ecuación que relaciona la absorbancia con la concentración de Trolox (Fig. 33): $y = -0,205x + 0,691$ ($R^2 = 0,999$). La pendiente negativa indica la decoloración que sufre el catión radical ABTS•+ al reaccionar con el antioxidante. Las concentraciones de Trolox evaluadas y absorbancias obtenidas se muestran en la Cuadro 18.

Cuadro 18. Resultados de la prueba ABTS•+ con patrones de Trolox.

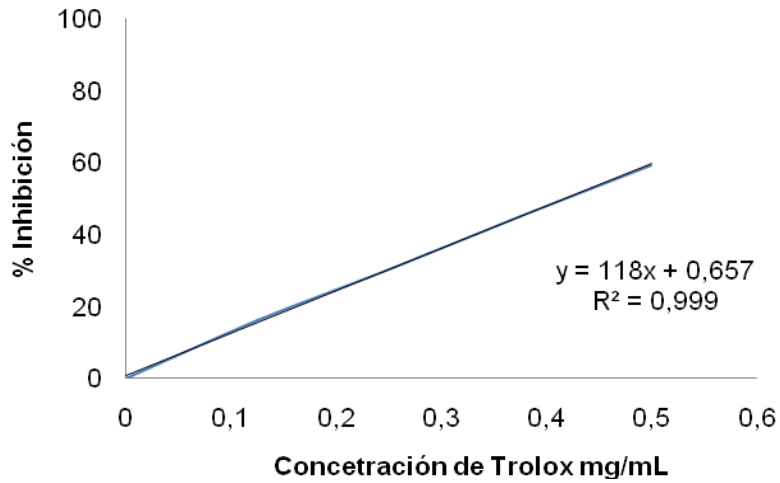
Concentración (mM)	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs Prom	SD
0	0,652	0,733	0,722	0,678	0,696	0,038
0,5	0,596	0,575	0,591	0,570	0,583	0,012
1	0,480	0,483	0,494	0,477	0,484	0,007
1,5	0,391	0,385	0,370	0,380	0,382	0,009
2	0,292	0,290	0,291	0,260	0,283	0,016

Figura 33. Curva de calibración Trolox.



Con los datos obtenidos en la curva de calibrado se calcularon los porcentaje de Inhibición y se los graficó, con el fin de determinar la concentración de antioxidante que da el mismo porcentaje de inhibición que una 1mM de Trolox a 734 nm. Los resultados de este ensayo se suelen expresar en unidades TEAC (actividad antioxidante equivalente a Trolox) y en VCEAC (actividad antioxidante equivalente a vitamina C). Este último caso es el más habitual cuando se trata de análisis de alimentos.

Figura 34. Porcentaje de inhibición de ABTS•+ con Trolox.



Dado que 1mM de Trolox equivale a 0,250 mg/mL, utilizando la ecuación $y = 118x + 0,657$ se calculó el porcentaje de inhibición de 1mM de Trolox, que es de 30,16%, por lo tanto, 0,250 mg/mL de Trolox inhibe el 30,16% de radical ABTS•+, este dato se lo utilizó para calcula el TEAC de los antioxidantes evaluados.

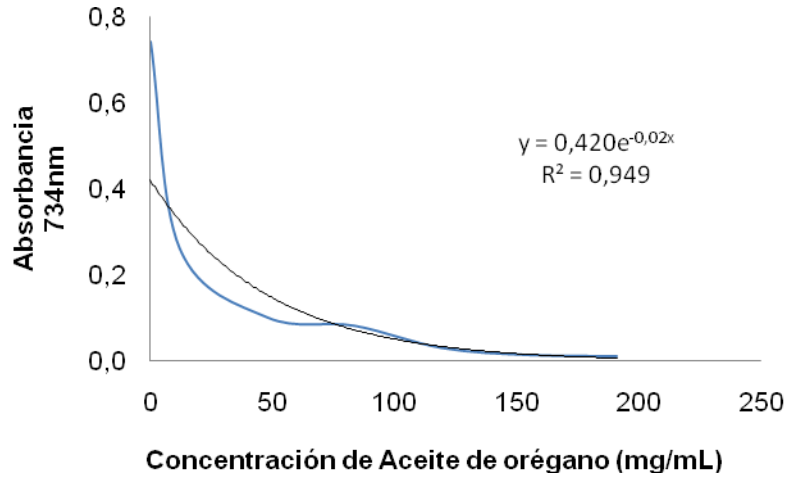
6.2.2.1 Ensayo de ABTS•+ con aceite esencial de orégano *Lippia origanoides* Kunth. La muestra se preparó en diferentes concentraciones 12.5, 50, 87.5, 125, 162.5 y 200 μ L/mL, estos valores se trasformaron a mg/mL; para ello se determinó la densidad del aceite de orégano por picnometría, siendo el promedio de tres mediciones igual a 0,9546 g/mL; por lo que las concentraciones anteriores equivalen a 11.93, 47.73, 83.52, 119.32, 155.12 y 190.91 mg/mL. Debido al alto poder antioxidante que presenta el aceite esencial de orégano se observó desde el minuto 1 una elevada disminución de la absorbancia por lo cual no se pudo calcular el TEAC ya que de la ecuación resulta un valor negativo; esto también ocurrió en el minuto 7. Los datos de la prueba de ABTS•+ en el minuto 1 se muestran en la Cuadro 19 y en la Fig. 35.

Cuadro 19. Prueba de ABTS•+ para el aceite de orégano (minuto 1 de reacción).

Concentración (mg/mL)	Abs $t=1$	Abs $t=1$	Abs $t=1$	Prom $t=1$	SD
0	0,75	0,745	0,73	0,742	0,010
11,9	0,298	0,241	0,243	0,261	0,032
47,7	0,093	0,113	0,097	0,101	0,011
83,5	0,071	0,081	0,092	0,081	0,011
119,3	0,024	0,026	0,039	0,030	0,008
155,1	0,017	0,013	0,01	0,013	0,004

190,9	0,014	0,009	0,009	0,011	0,003
-------	-------	-------	-------	-------	-------

Figura 35. Prueba de ABTS•+ para el aceite de orégano (minuto 1 de reacción).

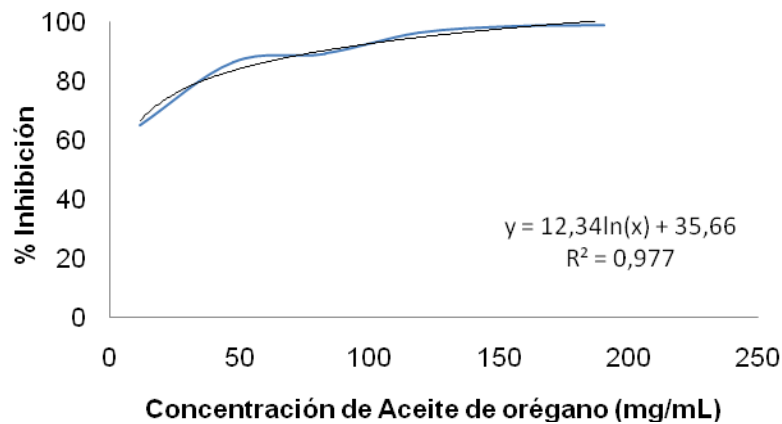


También se calculó el porcentaje de inhibición para el ABTS•+ en el minuto 1, los datos se muestran en la Cuadro 20 y el la Fig. 36.

Cuadro 20. Porcentaje de inhibición de ABTS•+ con aceite de orégano (minuto 1 de reacción).

Concentración (mg/mL)	% I _{t=1}	% I _{t=1}	% I _{t=1}	Prom _{t=1}	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000
11,9	60,27	67,65	66,71	64,88	4,020
47,7	87,60	84,83	86,71	86,38	1,413
83,5	90,53	89,13	87,40	89,02	1,571
119,3	96,80	96,51	94,66	95,99	1,162
155,1	97,73	98,26	98,63	98,21	0,450
190,9	98,13	98,79	98,77	98,56	0,373

Figura 36. Porcentaje de inhibición de ABTS•+ con diferentes concentraciones de aceite de orégano (minuto 1 de reacción).



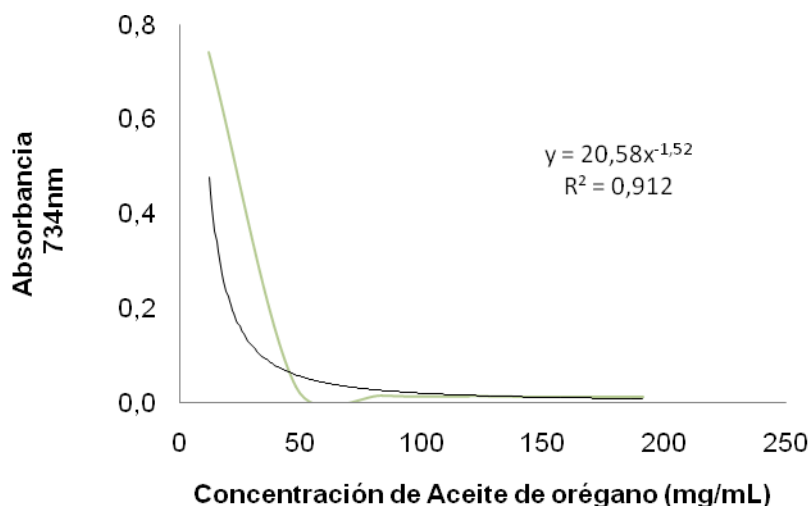
Utilizando la ecuación $y=12,34\ln(x)+35,66$ se calculó el TEAC, obteniendo como resultado $0,640\pm 0,3$ mg Trolox/mL AEO, por lo tanto, con una concentración de $0,640\text{mg/mL}$ de aceite de orégano se consigue el mismo porcentaje de inhibición del radical $\text{ABTS}\bullet+$ que con 1 mM de Trolox, equivalente a $30,16\%$ de radical $\text{ABTS}\bullet+$.

También se midió la reducción de la absorbancia del radical $\text{ABTS}\bullet+$ con diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano pasado un tiempo de 7 minutos de reacción, los datos obtenidos se muestran en la Cuadro 21 y la Fig. 37.

Cuadro 21. Prueba de $\text{ABTS}\bullet+$ para el aceite de orégano (minuto 7 de reacción).

Concentración (mg/mL)	Abs $t=7$	Abs $t=7$	Abs $t=7$	Prom $t=7$	SD
0	0,75	0,745	0,73	0,742	0,010
11,9	0,074	0,013	0,013	0,033	0,035
47,7	0,013	0,023	0,007	0,014	0,008
83,5	0,017	0,01	0,011	0,013	0,004
119,3	0,013	0,015	0,009	0,012	0,003
155,1	0,013	0,013	0,01	0,012	0,002
190,9	0,014	0,01	0,009	0,011	0,003

Figura 37. Prueba de $\text{ABTS}\bullet+$ para el aceite de orégano (minuto 7 de reacción).

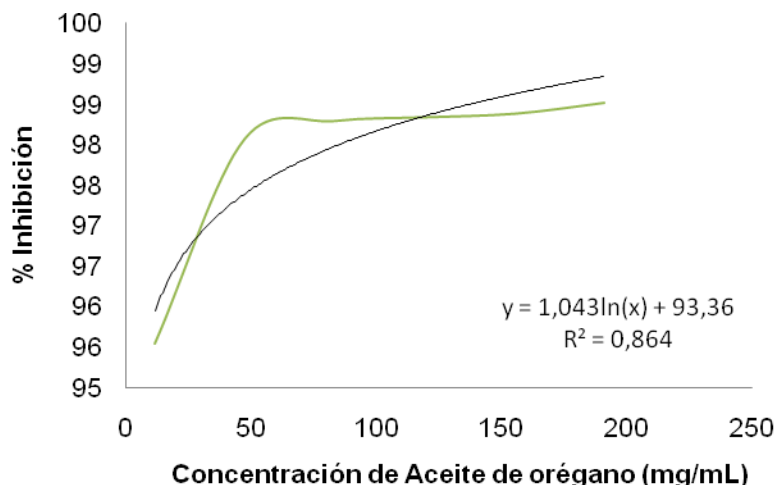


Con estos datos se calculó el porcentaje de inhibición para el minuto 7, los datos se muestran en la Cuadro 22.

Cuadro 22. Porcentaje de inhibición del radical ABTS•+ con diferentes concentraciones de aceite de orégano (minuto 7 de la reacción).

Concentración (mg/mL)	% I _{t=7}	% I _{t=7}	% I _{t=7}	Prom _{t=7}	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,000	0,000
11,9	90,13	98,26	98,22	95,536	4,679
47,7	98,27	96,91	99,04	98,074	1,077
83,5	97,73	98,66	98,49	98,295	0,493
119,3	98,27	97,99	98,77	98,340	0,395
155,1	98,27	98,26	98,63	98,384	0,213
190,9	98,13	98,66	98,77	98,519	0,339

Figura 38. Porcentaje de inhibición del radical ABTS•+ con diferentes concentraciones de aceite de orégano (minuto 7 de la reacción).



Matemáticamente, utilizando la ecuación $y=1,043\ln(x)+93,36$ se calculó el TEAC, obteniendo como resultado $4,83 \cdot E^{-27} \pm 0,3$ mg Trolox/mL AEO, por lo tanto, con una concentración de $4,83 \cdot E^{-27}$ mg/mL de aceite de orégano se consigue el mismo porcentaje de inhibición del radical ABTS•+ que con 1 mM de Trolox, equivalente a 30,16% de radical ABTS•+. Debido a que en las gráficas la inhibición que alcanzan

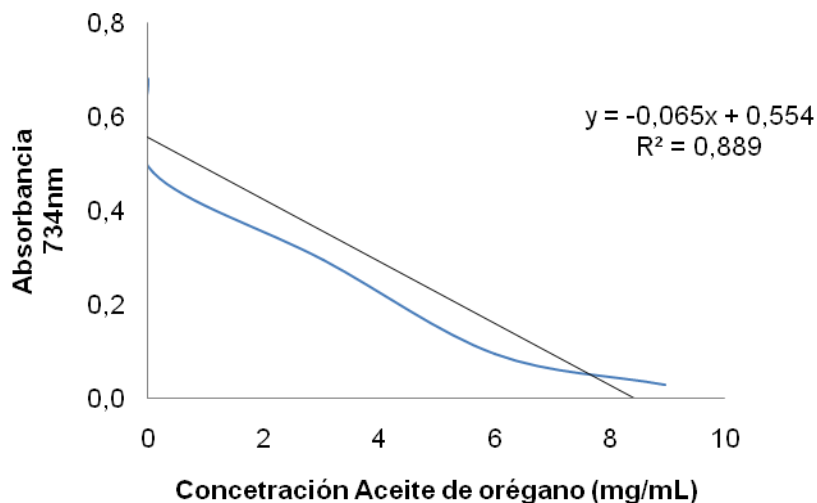
las concentraciones de aceite de orégano superan el 95% no se puede ubicar el valor de 30,16% de inhibición que corresponde a 1 mM de Trolox, por lo tanto el valor el TEAC encontrado no es confiable.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores se decidió utilizar concentraciones del aceite esencial más bajas 0.1, 3.2, 6.3 y 9.4 $\mu\text{L/mL}$; estos valores se trasformaron a mg/mL determinando la densidad del aceite de orégano por picnometría, siendo el promedio de tres mediciones igual a 0,9546 g/mL ; entonces las nuevas concentraciones evaluadas fueron: 0.09, 3.05, 6.01 y 8.97 mg/mL . Los resultados obtenidos se presentan en la Cuadro 23 y la Fig. 39.

Cuadro 23. Segunda prueba de ABTS•+ para el aceite de orégano (minuto 1 de reacción)

Concentración (mg/mL)	Abs $t=1$	Abs $t=1$	Abs $t=1$	Prom $t=1$	SD
0	0,675	0,682	0,688	0,682	0,007
0,09	0,358	0,527	0,559	0,481	0,108
3,05	0,321	0,221	0,344	0,295	0,065
6,01	0,125	0,078	0,083	0,095	0,026
8,97	0,025	0,035	0,025	0,028	0,006

Figura 39. Segunda prueba de ABTS•+ para el aceite de orégano (minuto 1 de reacción)

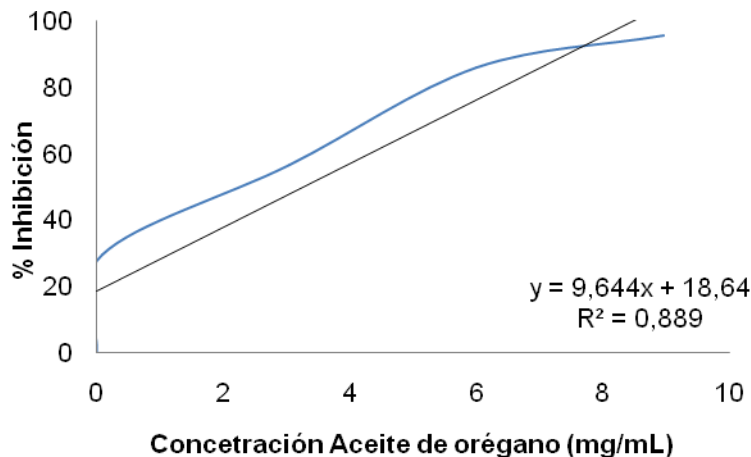


Con estos datos se calculó el porcentaje de inhibición del radical ABTS•+ al minuto 1 de la reacción, los datos se muestran en la Cuadro 24.

Cuadro 24. Segunda prueba porcentaje de inhibición de ABTS•+ con aceite de orégano (minuto 1 de reacción).

Concentración (mg/mL)	% I _{t=1}	% I _{t=1}	% I _{t=1}	Prom _{t=1}	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,000	0,000
0,09	46,96	22,73	18,75	29,480	15,271
3,05	52,44	67,60	50,00	56,680	9,532
6,01	81,48	88,56	87,94	85,994	3,920
8,97	96,30	94,87	96,37	95,844	0,846

Figura 40. Segunda prueba porcentaje de inhibición de ABTS•+ con aceite de orégano (minuto 1 de reacción).



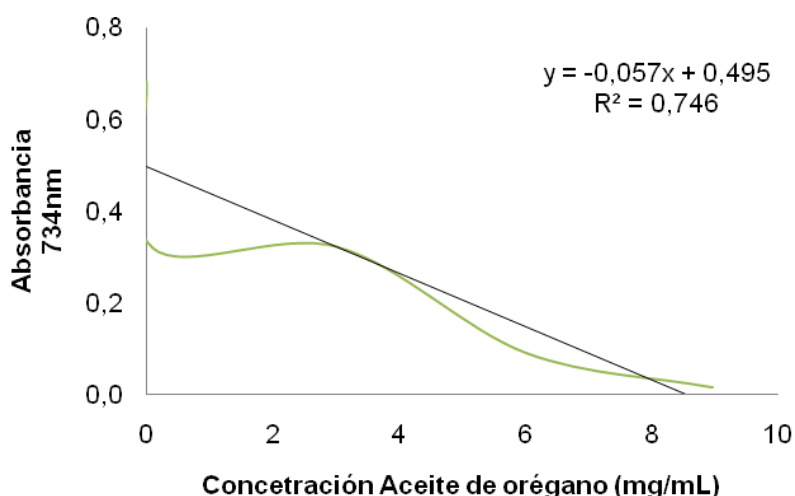
Utilizando la ecuación $y = 9,644x + 18,64$ se calculó el TEAC, obteniendo como resultado $1,16 \pm 0,5$ mg Trolox/mL AEO, por lo tanto, con una concentración de 1,16 mg/mL de aceite de orégano se consigue el mismo porcentaje de inhibición del radical ABTS•+ que con 1mM de Trolox, equivalente a 30,16% de radical ABTS•+.

Con las nuevas concentraciones de aceite esencial de orégano se midió también la reducción de la absorbancia del radical ABTS•+ a los 7 minutos de reacción, los datos obtenidos se muestran en la Cuadro 25 y la Fig. 41.

Cuadro 25. Segunda prueba de ABTS•+ para el aceite de orégano (minuto 7 de reacción).

Concentración (mg/mL)	Abs _{t=7}	Abs _{t=7}	Abs _{t=7}	Prom _{t=7}	SD
0	0,675	0,682	0,688	0,682	0,007
0,09	0,354	0,275	0,328	0,319	0,040
3,05	0,321	0,255	0,385	0,320	0,065
6,01	0,097	0,091	0,086	0,091	0,006
8,97	0,019	0,009	0,015	0,014	0,005

Figura 41. Segunda prueba de ABTS•+ para el aceite de orégano (minuto 7 de reacción).

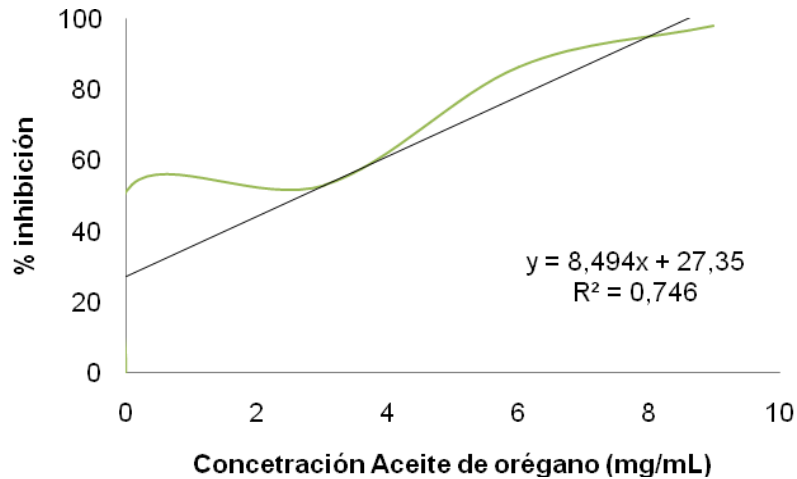


Con estos datos se calculó el porcentaje de inhibición del radical ABTS•+ con aceite esencial de orégano al minuto 7 de reacción, los resultados se muestran en la Cuadro 26 y la Fig. 42.

Cuadro 26. Porcentaje de inhibición de ABTS•+ con aceite de orégano (minuto 7 de reacción).

Concentración (mg/mL)	% I _{t=7}	% I _{t=7}	% I _{t=7}	Prom _{t=7}	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,000	0,000
0,09	47,56	59,68	52,33	53,186	6,107
3,05	52,44	62,61	44,04	53,032	9,299
6,01	85,63	86,66	87,50	86,596	0,937
8,97	97,19	98,68	97,82	97,895	0,750

Figura 42. Porcentaje de inhibición de ABTS•+ al minuto 7 con diferentes concentraciones de aceite de orégano.



Utilizando la ecuación $y = 8,494x + 27,35$ se calculó el TEAC del aceite de orégano para la prueba de ABTS•+ al minuto 7 de reacción, obteniendo como resultado $0,330 \pm 0,5$ mg Trolox/mL AEO, por lo tanto, con una concentración de 0,330 mg/mL de aceite de orégano se inhibe el mismo porcentaje que 1mM de Trolox, 30,16% de radical ABTS•+.

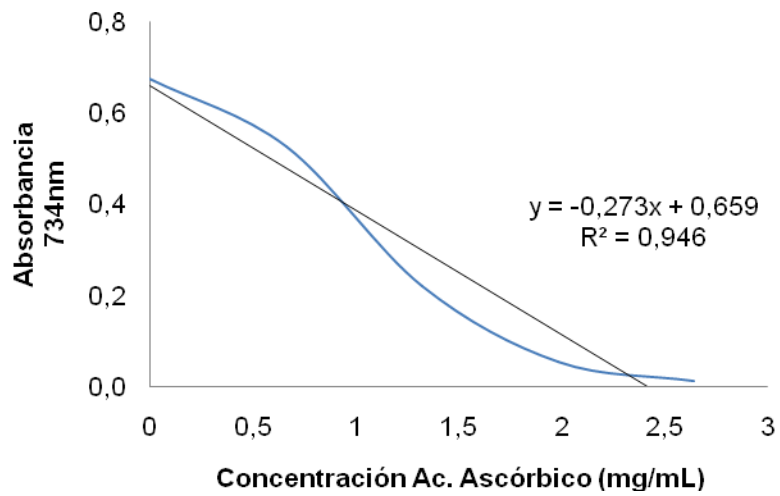
6.2.2.2 Evaluación de la capacidad de captura radical ABTS•+ de los antioxidantes convencionales ácido ascórbico, BHT y BHA y comparación con la del aceite esencial *Lippia origanoides* Kunth.

6.2.2.2.1 Ensayo de ABTS•+ con ácido ascórbico. Se evaluó la capacidad de captura de radicales ABTS•+ del ácido ascórbico utilizando las mismas concentraciones empleadas por Re *et al.*, (1999), 0–15 mM con el fin de obtener un valor de TEAC similar y comprobar la funcionalidad del método. Los ensayos se realizaron por triplicado y sus resultados se muestran en la Cuadro 27 y la Fig. 43.

Cuadro 27. Ensayo de ABTS•+ con ácido ascórbico (minuto 1 de reacción).

Concentración (mg/mL)	Abs _{t=1}	Abs _{t=1}	Abs _{t=1}	Prom _{t=1}	SD
0	0,65	0,682	0,699	0,677	0,025
0,66	0,529	0,528	0,527	0,528	0,001
1,32	0,231	0,22	0,212	0,221	0,010
1,98	0,054	0,059	0,051	0,055	0,004
2,64	0,01	0,011	0,016	0,012	0,003

Figura 43. Ensayo de ABTS•+ con ácido ascórbico (minuto 1 de reacción).

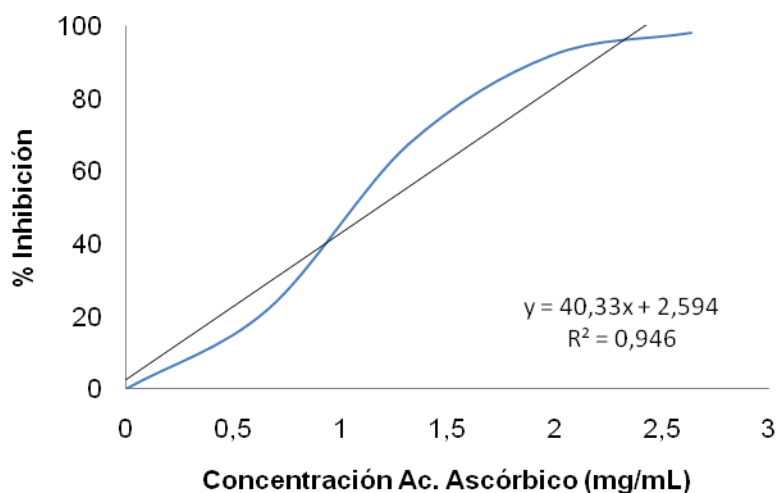


Con estos datos se calculó el porcentaje de inhibición del radical ABTS•+ con ácido ascórbico al minuto 1 de reacción, los resultados se muestran en la Cuadro 28 y la Fig. 44.

Cuadro 28. Porcentaje de inhibición de ABTS•+ con ácido ascórbico (minuto 1 de reacción).

Concentración (mg/mL)	% I _{t=1}	% I _{t=1}	% I _{t=1}	Prom _{t=1}	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,000	0,000
0,66	18,62	22,58	24,61	21,93	3,047
1,32	64,46	67,74	69,67	67,29	2,634
1,98	91,69	91,35	92,70	91,92	0,704
2,64	98,46	98,39	97,71	98,19	0,414

Figura 44. Porcentaje de inhibición de ABTS•+ con ácido ascórbico (minuto 1 de reacción).



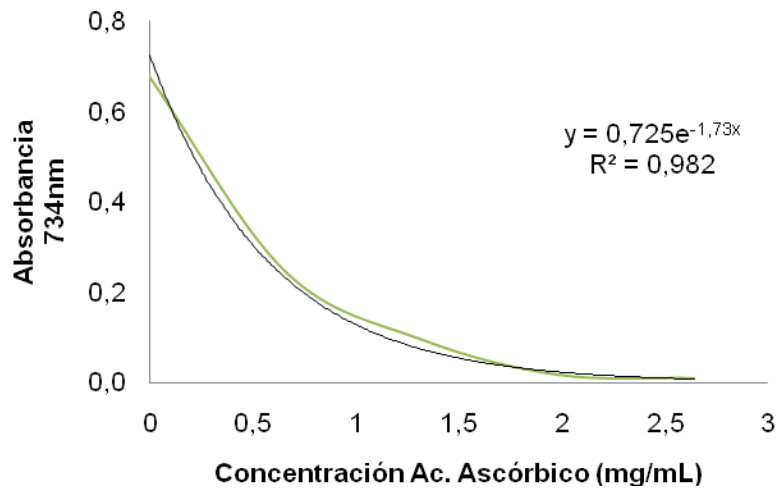
Utilizando la ecuación $y = 40,33x + 2,594$ se calculó el TEAC para el ácido ascórbico a 1 minuto de reacción, obteniendo como resultado $0,685 \pm 0,04$ mg Trolox/mL Ac ascórbico, por lo tanto, con una concentración de $0,685$ mg/mL de ácido ascórbico se consigue el mismo porcentaje de inhibición del radical ABTS•+ que con 1mM de Trolox, equivalente a 30,16% de radical ABTS•+.

Pasados 7 minutos en que la solución de ABTS•+ con ácido ascórbico estuvo en reposo se leyó nuevamente la absorbancia y se obtuvieron los siguientes datos.

Cuadro 29. Ensayo de ABTS•+ con ácido ascórbico (minuto 7 de reacción).

Concentración (mM)	Abs _{t=7}	Abs _{t=7}	Abs _{t=7}	Prom _{t=7}	SD
0	0,65	0,682	0,699	0,677	0,025
0,66	0,302	0,215	0,217	0,245	0,050
1,32	0,099	0,092	0,091	0,094	0,004
1,98	0,013	0,016	0,019	0,016	0,003
2,64	0,01	0,009	0,007	0,009	0,002

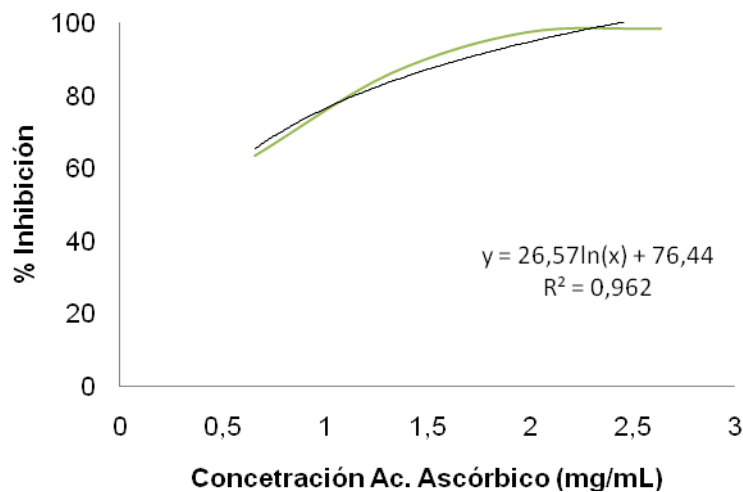
Figura 45. Ensayo de ABTS•+ con ácido ascórbico (minuto 7 de reacción).



Cuadro 30. Porcentaje de inhibición de ABTS•+ con ácido ascórbico (minuto 7 de reacción).

Concentración (mg/mL)	% I _{t=7}	% I _{t=7}	% I _{t=7}	Prom _{t=7}	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,000	0,000
0,66	53,54	68,48	68,96	63,656	8,766
1,32	84,77	86,51	86,98	86,087	1,165
1,98	98,00	97,65	97,28	97,645	0,359
2,64	98,46	98,68	99,00	98,713	0,270

Figura 46. Porcentaje de inhibición de ABTS•+ con ácido ascórbico (minuto 7 de reacción)



Utilizando la ecuación $y = 26,57 \ln(x) + 76,44$ se calculó el TEAC para el ácido ascórbico a los 7 minutos de reacción, obteniendo como resultado $0,175 \pm 0,1$ mg Trolox/mL Ac. ascórbico, por lo tanto, con una concentración de $0,175$ mg/mL de ácido ascórbico se consigue el mismo porcentaje de inhibición del radical ABTS•+ que con 1mM de Trolox, equivalente a 30,16% de radical ABTS•+.

Los valores de TEAC para el ácido ascórbico con el ensayo del radical ABTS•+ que se obtuvieron en el presente trabajo son muy similares al que fue obtenido Re *et al.*, (1999), lo que significa que el procedimiento empleado es reproducible y los datos obtenidos son confiables (Cuadro 31).

Cuadro 31. Comparación de resultados TEAC.

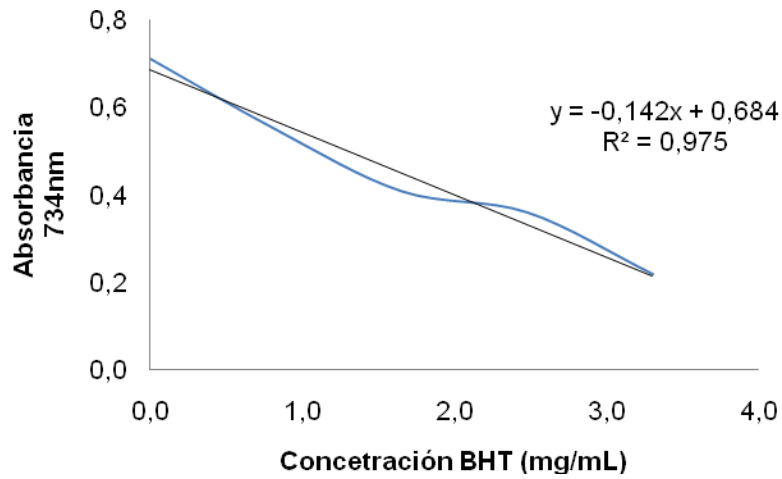
Antioxidante	TEAC mg Trolox/mL Ac ascórbico		TEAC mM		TEAC mM Re <i>et al.</i> (1999)
	Min 1	Min 7	Min 1	Min 7	Min 1-7
Ácido ascórbico	$0,685 \pm 0,04$	$0,175 \pm 0,1$	$3,88 \pm 0,04$	$0,994 \pm 0,1$	$1,05 \pm 0,02$

6.2.2.2.2 Ensayo de ABTS•+ con BHT. Se evaluó la capacidad de captura de radicales ABTS•+ con el antioxidante convencional BHT de uso común en la industria de alimentos, para ello se utilizaron las mismas concentración y procedimiento empleado para el ensayo con el ácido ascórbico con el fin de poder comparar el valor de TEAC obtenido. Los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados se muestran en la Cuadro 32 y la Fig. 47.

Cuadro 32. Ensayo de ABTS•+ con BHT (minuto 1 de reacción).

Concentración (mg/mL)	Abs $t=1$	Abs $t=1$	Abs $t=1$	Prom $t=1$	SD
0,00	0,71	0,712	0,713	0,712	0,002
0,83	0,58	0,528	0,542	0,550	0,027
1,65	0,41	0,412	0,405	0,409	0,004
2,48	0,324	0,376	0,382	0,361	0,032
3,31	0,235	0,162	0,261	0,219	0,051

Figura 47. Ensayo de ABTS•+ con BHT (minuto 1 de reacción).

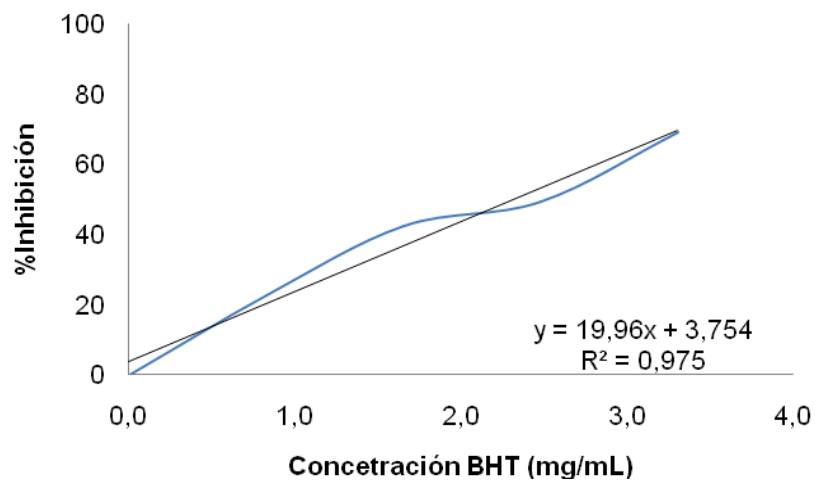


Con estos datos se calculó el porcentaje de inhibición de radicales ABTS•+ con el BHT al minuto 1 de reacción, los resultados se muestran en la Cuadro 33 y la Fig. 48.

Cuadro 33. Porcentaje de inhibición de ABTS•+ con BHT (minuto 1 de reacción).

Concentración (mg/mL)	% I _{t=1}	% I _{t=1}	% I _{t=1}	Prom _{t=1}	SD
0,00	0,00	0,00	0,00	0,000	0,000
0,83	18,31	25,84	23,98	22,712	3,924
1,65	42,25	42,13	43,20	42,529	0,582
2,48	54,37	47,19	46,42	49,327	4,381
3,31	66,90	77,25	63,39	69,181	7,202

Figura 48. Porcentaje de inhibición de ABTS•+ con BHT (minuto 1 de reacción).



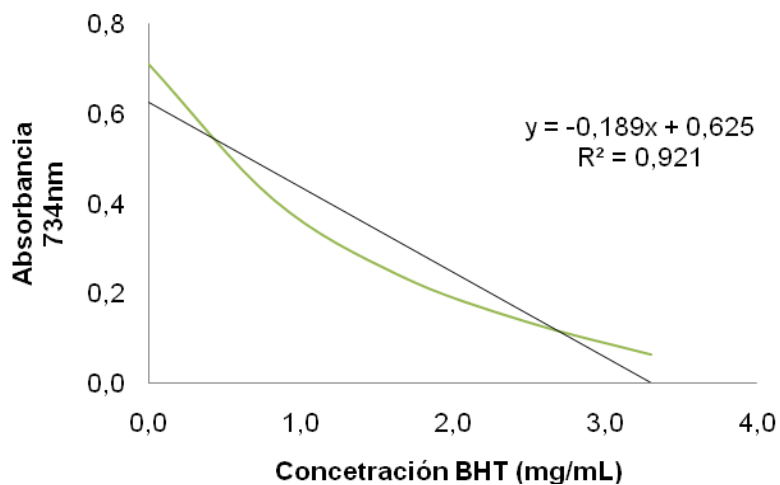
Utilizando la ecuación $y = 19,96x + 3,754$ se calculó el porcentaje de inhibición de radicales $ABTS^{\bullet+}$ con el BHT al minuto 1 de reacción, el resultado fue $1,32 \pm 0,04$ mg Trolox/mL BHT, lo que significa que con una concentración de 1,32 mg/mL de BHT se inhibe 30,16% de radicales $ABTS^{\bullet+}$, igual porcentaje que 1mM de Trolox.

Pasados 7 minutos en que la solución de $ABTS^{\bullet+}$ con BHT estuvo en reposo se leyó nuevamente la absorbancia y se obtuvieron los siguientes datos.

Cuadro 34. Ensayo de $ABTS^{\bullet+}$ con BHT (minuto 7 de reacción)

Concentración (mg/mL)	Abs _{t=7}	Abs _{t=7}	Abs _{t=7}	Prom _{t=7}	SD
0,00	0,71	0,712	0,713	0,712	0,002
0,83	0,404	0,415	0,407	0,409	0,006
1,65	0,201	0,292	0,229	0,241	0,047
2,48	0,126	0,156	0,134	0,139	0,016
3,31	0,077	0,047	0,071	0,065	0,016

Figura 49. Ensayo de $ABTS^{\bullet+}$ con BHT (minuto 7 de reacción).

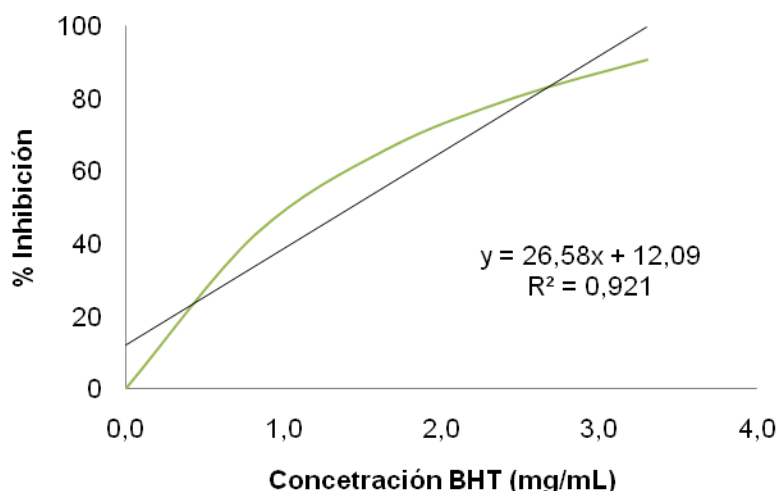


Con estos datos se calculó el porcentaje de inhibición para el minuto 7, los datos se muestran en la Cuadro 35.

Cuadro 35. Porcentaje de inhibición de $ABTS^{\bullet+}$ con BHT (minuto 7 de reacción).

Concentración (mg/mL)	% I _{t=7}	% I _{t=7}	% I _{t=7}	Prom _{t=7}	SD
0,00	0,00	0,00	0,00	0,000	0,000
0,83	43,10	41,71	42,92	42,576	0,753
1,65	71,69	58,99	67,88	66,187	6,518
2,48	82,25	78,09	81,21	80,517	2,166
3,31	89,15	93,40	90,04	90,865	2,239

Figura 50. Porcentaje de inhibición de ABTS•+ con BHT (minuto 7 de reacción).



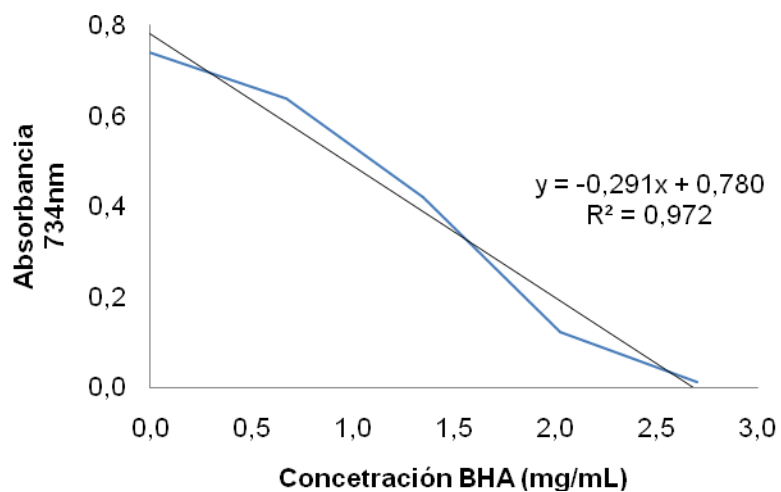
Utilizando la ecuación $y = 26,58x + 12,09$ se calculó el porcentaje de inhibición del BHT al minuto 7, que es de $0,556 \pm 0,05$ mg Trolox/mL BHT, por lo tanto, con una concentración de $0,679$ mg/mL de BHT se inhibe el mismo porcentaje de radical ABTS•+ $30,16\%$ que 1 mM de Trolox.

6.2.2.2.3 Ensayo de ABTS•+ con BHA. Se evaluó el BHA utilizando las mismas concentraciones y procedimiento empleado para el ácido ascórbico con el fin de poder comparar los valores de TEAC obtenidos. Los ensayos se realizaron por triplicado y se muestran en la Cuadro 36 y la Fig. 51.

Cuadro 36. Ensayo de ABTS•+ con BHA (minuto 1 de reacción).

Concentración (mg/mL)	Abs _{t=1}	Abs _{t=1}	Abs _{t=1}	Prom _{t=1}	SD
0,00	0,749	0,745	0,725	0,740	0,013
0,68	0,638	0,647	0,632	0,639	0,008
1,35	0,402	0,428	0,429	0,420	0,015
2,03	0,127	0,12	0,117	0,121	0,005
2,70	0,013	0,014	0,011	0,013	0,002

Figura 51. Ensayo de ABTS•+ con BHA (minuto 1 de reacción).

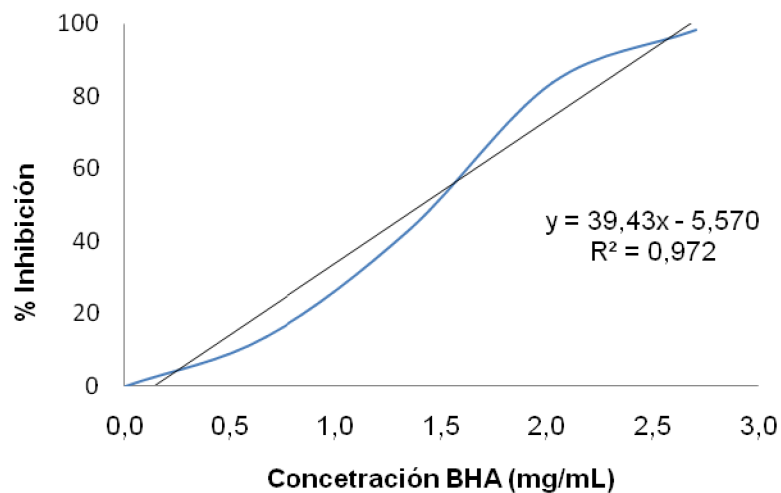


Se calculó el porcentaje de inhibición de radicales ABTS•+ con el antioxidante BHA a un tiempo de reacción de 1 minuto, los resultados se muestran en la Cuadro 37 y la Fig. 52.

Cuadro 37. Porcentaje de inhibición de ABTS•+ con BHA (minuto 1 de reacción).

Concentración (mg/mL)	% I _{t=1}	% I _{t=1}	% I _{t=1}	Prom _{t=1}	SD
0,00	0,00	0,00	0,00	0,000	0,000
0,68	14,82	13,15	12,83	13,601	1,068
1,35	46,33	42,55	40,83	43,235	2,814
2,03	83,04	83,89	83,86	83,600	0,481
2,70	98,26	98,12	98,48	98,289	0,182

Figura 52. Porcentaje de inhibición de ABTS•+ con BHA (minuto 1 de reacción).



Utilizando la

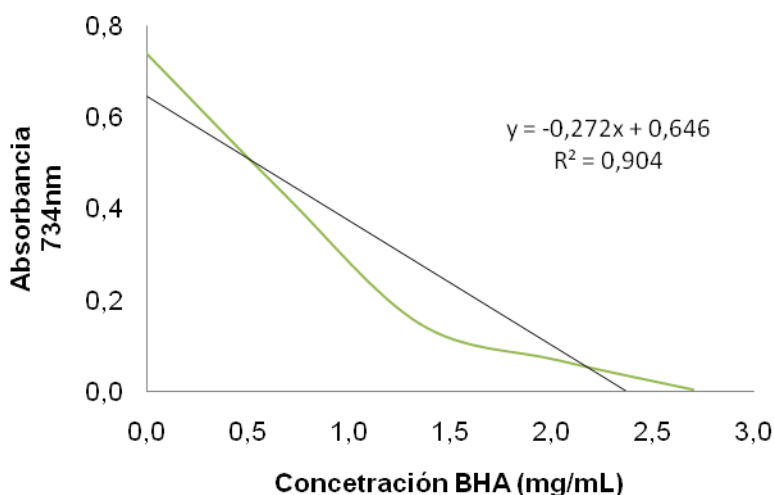
ecuación $y = 39,43x - 5,570$ se calculó el porcentaje de inhibición de radicales $ABTS^{\bullet+}$ con BHA a 1 minuto de reacción, el resultado fue $0,906 \pm 0,02$ mg Trolox/mL BHA, por lo tanto, con una concentración de $0,906$ mg/mL de BHA se inhibe el mismo porcentaje de radicales $ABTS^{\bullet+}$ que 1 mM de Trolox $30,16\%$.

Siguiendo el mismo procedimiento se midió la absorbancia de la solución de $ABTS^{\bullet+}$ a los 7 minutos de reacción con el antioxidante BHA, los resultados se muestran en la Cuadro 38 y la Fig. 53.

Cuadro 38. Ensayo de $ABTS^{\bullet+}$ con BHA (minuto 7 de reacción).

Concentración (mg/mL)	Abs _{t=7}	Abs _{t=7}	Abs _{t=7}	Prom _{t=7}	SD
0,00	0,749	0,745	0,725	0,740	0,013
0,68	0,472	0,421	0,408	0,434	0,034
1,35	0,156	0,155	0,132	0,148	0,014
2,03	0,084	0,055	0,066	0,068	0,015
2,70	0,004	0,004	0,000	0,003	0,002

Figura 53. Ensayo de $ABTS^{\bullet+}$ con BHA (minuto 7 de reacción).

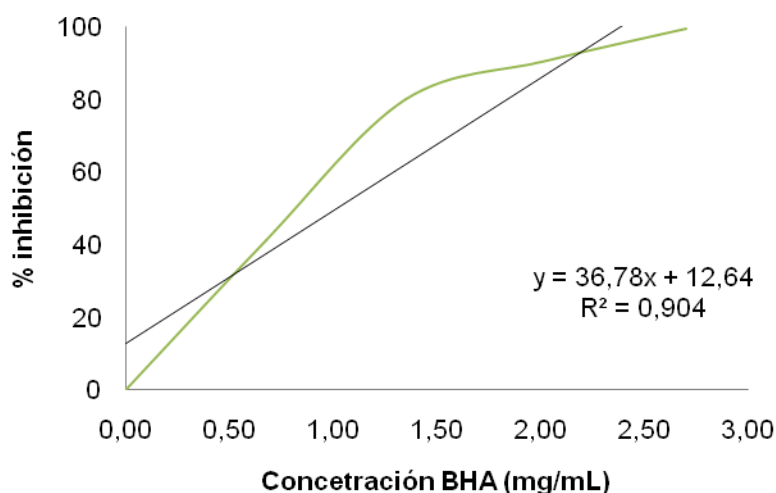


Los resultados del cálculo de porcentaje de inhibición para la prueba de $ABTS^{\bullet+}$ con BHA se muestran en la Cuadro 39 y la Fig. 54.

Cuadro 39. Porcentaje de inhibición de ABTS•+ con BHA (minuto 7 de reacción).

Concentración (mg/mL)	% I _{t=7}	% I _{t=7}	% I _{t=7}	Prom _{t=7}	SD
0,00	0,00	0,00	0,00	0,000	0,000
0,68	36,98	43,49	43,72	41,399	3,826
1,35	79,17	79,19	81,79	80,053	1,507
2,03	88,79	92,62	90,90	90,766	1,920
2,70	99,47	99,46	100,00	99,643	0,309

Figura 54. Porcentaje de inhibición de ABTS•+ con BHA (minuto 7 de reacción).



Se calculó el porcentaje de inhibición de radicales ABTS•+ con el antioxidante BHA al minuto 7 de reacción utilizando la ecuación $y = 36,78x + 12,64$, lo que dio como resultado $0,476 \pm 0,04$ mg Trolox/mL BHA, por lo tanto, con una concentración de $0,476$ mg/mL de BHA se inhibe el mismo porcentaje de radicales ABTS•+ que 1 mM de Trolox $30,16\%$.

Cuadro 40. Resumen de resultados del ensayo de ABTS•+

TEAC (mg Trolox/mL SE)	1 min	7 min
Aceite de Orégano	$1,16 \pm 0,5$	$0,330 \pm 0,5$
Ácido Ascórbico	$0,685 \pm 0,04$	$0,175 \pm 0,1$
BHT	$1,32 \pm 0,04$	$0,679 \pm 0,05$
BHA	$0,906 \pm 0,02$	$0,476 \pm 0,04$

Figura 55. Resumen de resultados del ensayo de ABTS•+ (minuto 1 de reacción).

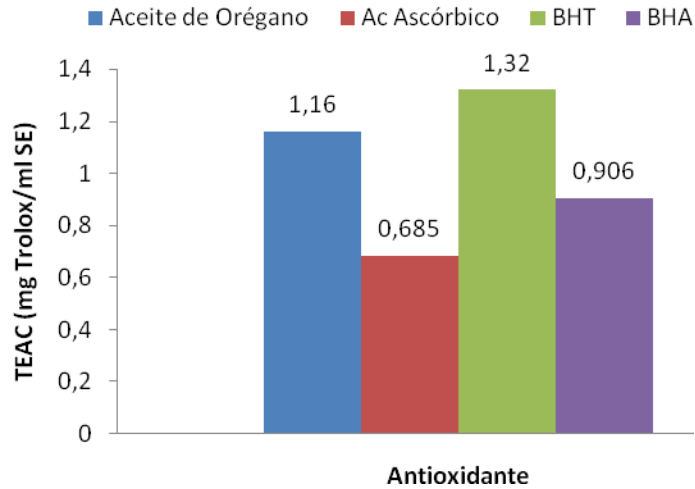
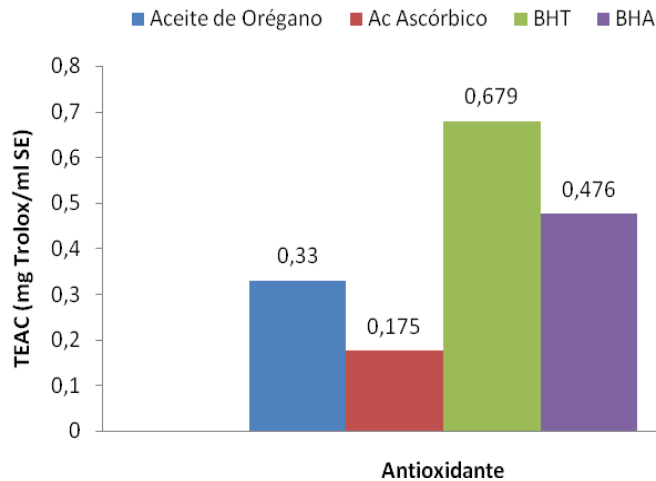


Figura 56. Resumen de resultados del ensayo de ABTS•+ (minuto 7 de reacción).



A pesar de que muchos autores reportan los resultados de la actividad antioxidante de extractos y aceites esenciales evaluados por el ensayo ABTS•+ por medio del indicador TEAC, existe una discusión en cuanto a que este parámetro solo se puede emplear en sustancias puras. Vargas *et al.*, (2008) mencionan que la capacidad de atrapamiento de radicales por el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS•+ se expresa como capacidad antioxidante equivalente al Trolox® (TEAC), para el caso de sustancias puras o como actividad

antioxidante total (TAA), para el caso de mezclas de sustancias como los aceites esenciales. Por esta razón se calculó el TAA para los antioxidantes utilizados en este estudio, los resultados se muestran en la Fig. 57 y Fig. 58.

Figura 57. Valores de TAA para los antioxidantes evaluados en este estudio (minuto 1 de reacción).

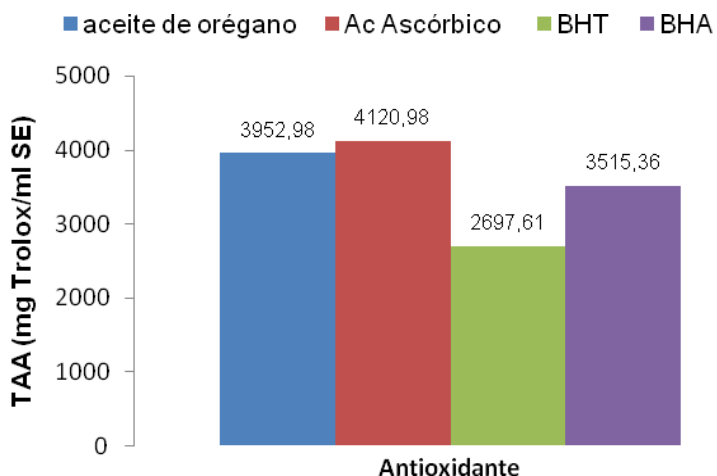
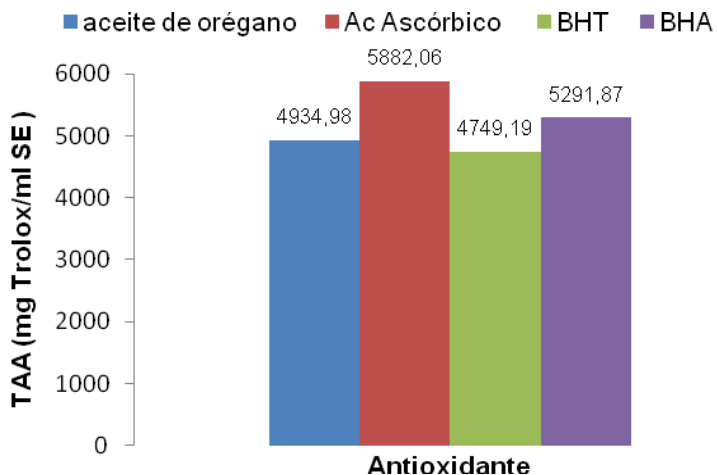


Figura 58. Valores de TAA para los antioxidantes evaluados en este estudio (minuto 7 de reacción).



Con los resultados se puede observar que el aceite esencial de orégano *L. origanoides* Kunth tiene un alto poder antioxidante ya únicamente lo supera el ácido ascórbico, que es uno de los antioxidantes naturales más empleados en la industria alimentaria; el TEAC del AEO es 1,8 veces mayor que el ácido ascórbico, lo cual indica que este aceite es un eficiente antioxidante, también se puede

observar que el aceite tiene un valor TEAC mucho mas bajo que antioxidantes comerciales como el BHT y BHA.

Al comparar los datos obtenidos de TEAC y TAA cuando la reacción a concluido (minuto 7) se observa que en ambos casos el ácido ascórbico es el mejor antioxidante con un TEAC de 0,175 mg Trolox/mL ac. ascórbico y un TAA de 5882,06 mg Trolox /mL de sustancia, para el caso del TEAC le sigue el aceite esencial de orégano con 0,33 mg Trolox /mL AEO, pero esto no ocurre en TAA puesto que el segundo mejor antioxidante es el el BHA con 5291,87 mg Trolox /mL de sustancia. En conclusion el orden para el TEAC es ácido ascórbico>aceite de orégano>BHA>BHT; y para el TAA es ácido ascórbico>BHA >aceite de orégano >BHT.

Henao *et al.*, (2009), encontraron que el aceite de orégano (*Origanum vulgare*) tiene una actividad antioxidante total expresada en terminos porcentuales mayor que el BHA y BHT, los resultados encontrados fueron orégano (87,51%) BHA (14,71%) y BHT (18,17%), en este mismo trabajo tambien se evaluó la actividad antioxidante total de lo de los aceites de tomillo (44,84%) y clavo de olor (94,98%).

En otra investigación se evaluó el potencial inhibitorio del radical ABTS•+ de distintos aceites esenciales, dando como resultado que éste fue más alto para los aceites esenciales que contienen fenoles (carvacrol y timol) frente a los aceites esenciales ricos en éteres (*trans*-anetol y estragol). La actividad antioxidante total mediante el ensayo ABTS•+ en orden decreciente fue: AE *Plectranthus amboinicus* AE *Lippia origanoides* > AE *Thymus vulgaris* > AE *Lippia micromera* >>> AE *Tagetes lucida* (flores) > AE *Ocimum sp.* > AE *Tagetes lucida* (hojas) > AE *Illicium verum* > AE *Tagetes flifolia* (Cenivam) > AE *Foeniculum vulgare* (Acevedo *et al.*, 2009).

Muchas investigaciones relacionan la capacidad antioxidante con el contenido de fenoles totales y las antocianinas (Ursini *et al.*, 1996), para el caso del aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides* Kunth) del Alto Patía empleado en esta investigación esta capacidad antioxidante puede atribuirse a la presencia de compuestos fenólicos como el timol, componente mayoritario en su composición (73%).

Esto sugiere que el aceite esencial de orégano es un antioxidante muy eficaz al ser comparado con otros aceites esenciales y con antioxidantes convencionales; esto sin duda muestra un futuro promisorio para este aceite ya que puede llegar a remplazar el uso antioxidantes sinteticos; el conflicto principal surge al tener un

característico sabor y olor fuerte que podría afectar el flavor de los alimentos. En cualquier caso, deberá ser sometido a rigurosos análisis para evaluar la influencia en las características organolépticas de los alimentos.

Como es el caso del romero al cual se le atribuye una buena capacidad antioxidante según evaluaciones realizadas en matrices cárnicas, se distinguen dos clases de antioxidantes: endógenos y exógenos, los endógenos que son suministrados en la dieta del animal y los exógenos que son administrados durante el procesamiento de alimentos. Dentro de esta búsqueda de antioxidante naturales en el procesamiento de las carnes entre los evaluados están además del romero, la cebolla, ajo, canela y pimienta negra, los extractos de esta última que fueron obtenidos por el método de extracción con dióxido de carbono en estado supercríticos que inhiben de forma efectiva la oxidación de los lípidos en carne picada de cerdo, la actividad antioxidante de esta especie se atribuye a la piperina y sus isómeros (Tisrisukond *et al.*, 1998).

También han sido evaluados diferentes extractos naturales en matrices lácteas; el extracto de romero para aumentar la estabilidad de la mantequilla frente al deterioro oxidativo encontrándose que el efecto depende proporcionalmente de la concentración empleada (Zagarska *et al.*, 1996) otra investigación aplica el aceite esencial de tomillo y comino sobre este mismo producto lácteo, los cuales pueden prevenir la oxidación de este producto cuando es almacenada a temperatura ambiente; a una concentración de 200ppm los aceites esenciales de estas plantas fueron más efectivos que el BHT. (Frag *et al.*, 1990).

El extracto de tomillo constituido por un 98% de timol y ácido ascórbico fue incorporado a la dieta de gallinas ponedoras, observándose que aporta estabilidad a la yema de los huevos y estabilidad frente a la oxidación de los mismos, se destaca que el extracto de tomillo, rico en timol, es el mejor inhibidor de la oxidación y que el ácido ascórbico puede ejercer un efecto prooxidante (Botsoglou *et al.*, 1997).

Estos resultados donde los extractos naturales superan los antioxidantes sintéticos, abren paso a que el enfoque principal de determinar la capacidad antioxidante del aceite de orégano sea la posible incorporación de éste a la alimentación animal como aditivo nutracéutico, de ésta manera actuaría como antioxidante endógeno.

6.3 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIFÚNGICA DEL ACEITE DE ORÉGANO

Se aplicó un diseño irrestrictamente al azar DIA con arreglo factorial para los tratamientos mostrados en la Cuadro 1. Ensayos preliminares con aceite de orégano definieron el intervalo evaluado excluyendo concentraciones mayores en las cuales no se observó crecimiento del patógeno.

Para lograr una adecuada dilución del aceite de orégano en el medio de cultivo de *P. infestans* fue necesario utilizar el agente emulsionante Tween 20. La cantidad de Tween 20 a utilizar se determinó mediante la realización de varios ensayos, los cuales se muestran en la Cuadro 41.

Cuadro 41. Ensayos de emulsificación del aceite de orégano con Tween 20

Ensayo	AEO (mL)	Tween 20 (mL)	Agar (mL)	Homogeneidad de la emulsión
1	1	1	1	Mala
2	0,5	0,3	5	Regular
3	1	0,1	10	Mala
4	1	0,2	10	Regular
5	0,8	1,5	10	Buena
6	0,5	1	10	Muy buena

Se eligió el ensayo 6 para preparar el medio de cultivo ya que se logra que el aceite de orégano se diluya bien sin observarse separación de fases.

Para comprobar que el producto Tween 20 usado como emulsionante del AEO no tuvo efecto sobre el patógeno y que la inhibición de éste se debe únicamente a la acción del AEO, se realizaron ensayos con el Tween 20 en las mismas condiciones que en las que se evaluó el aceite.

Los valores de diámetro de crecimiento de *P. infestans* obtenidos en cada tratamiento son convertidos en términos porcentuales utilizando la relación propuesta por Riveros ecuación 6, y se muestran en el ANEXO F.

El análisis estadístico arrojó el siguiente resultado.

Cuadro 42. Análisis de varianza (ANOVA) para porcentaje de crecimiento para producto.

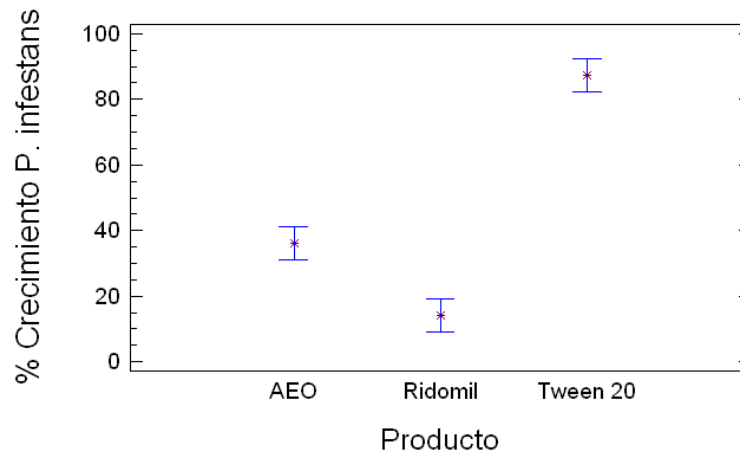
Fuente	Suma de cuadrados	GL	Mínimos cuadrados	Valor F	Valor P
Principales Efectos					
A:Concentración	57934,1	6	9655,68	30,62	0,00001
B:Producto	98643,0	2	49321,5	156,40	0,00001
RESIDUAL	30273,3	96	315,347		
TOTAL (corregido)	186850,0	104			

Dado que el valor P es menor que 0,05 demuestra que hay diferencias estadísticamente significativas entre los productos con los cuales se evaluó el crecimiento del patógeno, por lo tanto se procedió a realizar la prueba de rangos múltiples de Tukey, con el fin de determinar si hay grupos homogéneos.

Cuadro 43. Pruebas de rangos múltiples para porcentaje de crecimiento con relación al producto (prueba de Tukey con 95% de nivel de confianza)

Producto	Media	Grupos Homogéneos		
Ridomil	14,28	X		
AEO	35,95		X	
Tween 20	87,37			X

Figura 59. Prueba de Tukey para porcentaje de crecimiento respecto al producto (prueba de Tukey con 95% de nivel de confianza)



En Cuadro 44 y Fig. 59 se muestra que existe diferencias significativas entre todos los productos, de tal manera que el AEO expresa un crecimiento medio de 35,95%, el Ridomil 14,28% y el Tween 20 87,37%, estos porcentajes al ser evaluados con la escala de Shattock expresan que el patógeno presenta una sensibilidad intermedia frente al AEO y Ridomil, siendo mas alto el efecto del AEO; en cuanto al Tween 20, según la escala de sensibilidad esta en un nivel resistente, por lo anterior se concluye que éste no presenta ningún tipo de inhibición sobre la *P. infestans*, y que la inhibición que observa en los ensayos con el AEO se deben únicamente a la acción sinérgica de sus componentes.

Figura 60. Cajas Petri sembradas con *P. infestans* y aceite esencial de orégano.

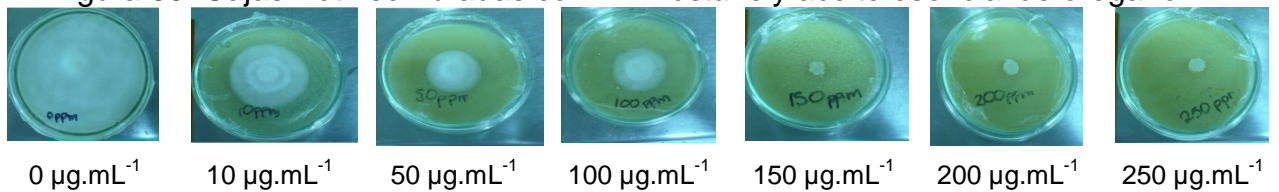


Figura 61. Cajas Petri sembradas con *P. infestans* y Ridomil®.

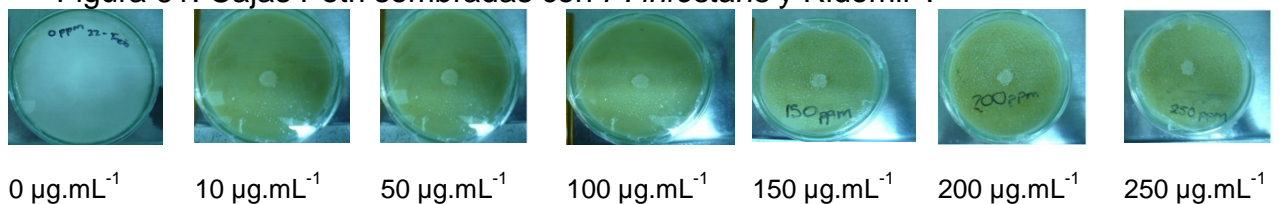
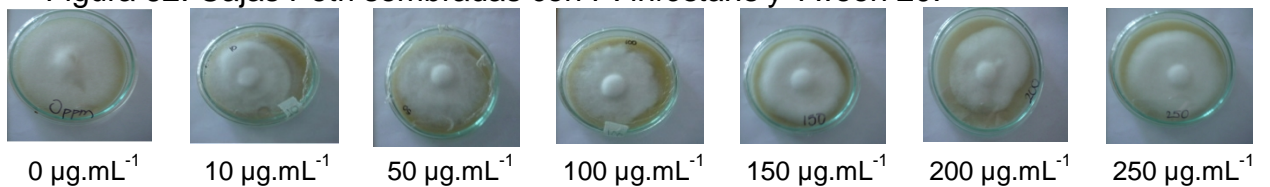


Figura 62. Cajas Petri sembradas con *P. infestans* y Tween 20.



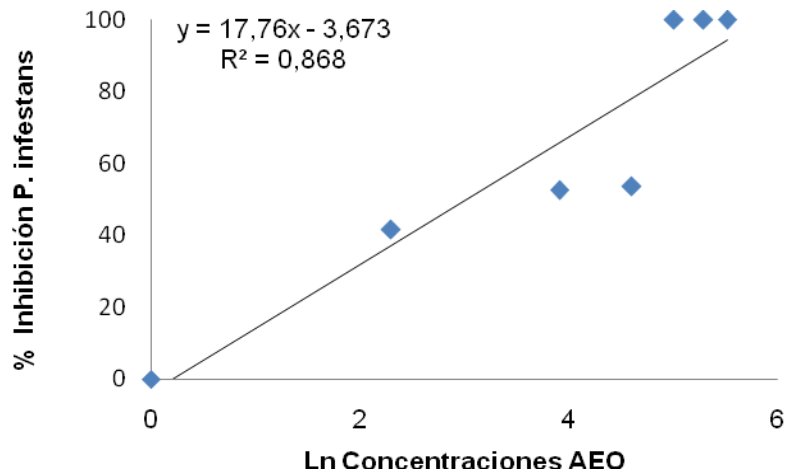
Al realizar la comparación del efecto de los tres productos en cada concentración se observa como se menciona anteriormente que el Tween 20 no presenta relevancia como inhibidor del crecimiento del patógeno (Fig. 62), por el contrario, el Ridomil si presentó inhibición en el crecimiento del patógeno desde la mínima concentración 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, (Fig. 61). En el aceite de orégano (Fig. 60) se observa que existe una diferencia creciente de la inhibición proporcional a las concentraciones evaluadas. Esto se muestra junto a la evaluación de Shattock en la Cuadro 44.

Cuadro 44. Evaluación del porcentaje de crecimiento medio con respecto a la escala Shattock para las concentraciones evaluadas del aceite de orégano.

Concentración ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Porcentaje de crecimiento medio con respecto al testigo	Evaluación
0	100,0	Resistente
10	58,4	Intermedio
50	47,5	Intermedio
100	46,4	Intermedio
150-250	0	Sensible

Los resultados de las concentraciones evaluadas se ajustan a los tres niveles de sensibilidad propuestos en la escala de Shattock, por tanto se definen tres grupos: el primero corresponde a una concentración cero (sin aceite esencial), el segundo grupo con concentraciones de 10-50-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ y el tercero con concentraciones de 150-200-250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ cuyo porcentaje de crecimiento es cero.

Figura 63. Porcentaje de inhibición *P. infestans* respecto al logaritmo natural de la concentración de AEO.

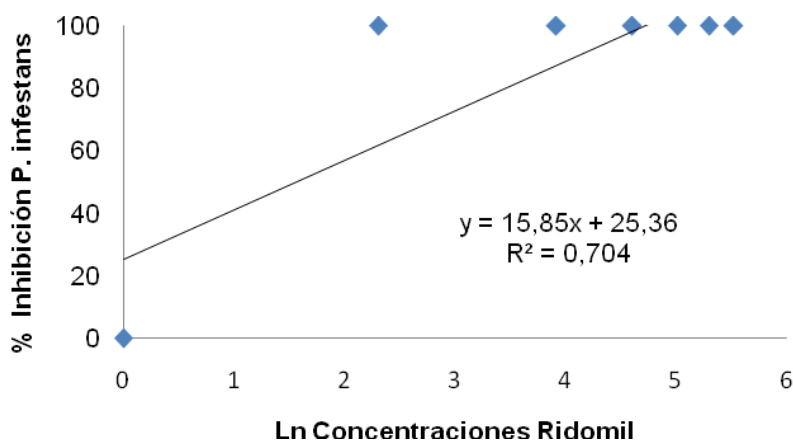


El ajuste rectilíneo de la Fig. 63 arrojó la siguiente ecuación $Y = 17,76x - 3,673$ con un $R^2 = 0,868$. El valor de CE_{50} , es decir, la concentración de AEO que permite lograr una inhibición en el crecimiento del patógeno del 50%, es de 20,53 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Se encontró que para este ensayo la concentración letal (CL) es de 150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ según la Cuadro 44, debido a que desde esa concentración no hay crecimiento del patógeno.

Para corroborar la ejecución correcta del método se encontró el valor CE_{50} de Ridomil® para compararlo, se graficó el porcentaje de crecimiento de *P. infestans*

respecto del logaritmo natural de las concentraciones de Ridomil® evaluadas. El ajuste rectilíneo de la gráfica arrojó la siguiente ecuación $Y = 15,85x + 25,36$ con un $R^2 = 0,704$, con la cual se obtuvo un CE_{50} de $4,73 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de Ridomil®.

Figura 64. Porcentaje de crecimiento de *P. infestans* con relación al logaritmo natural de la concentración de Ridomil®.



García *et al.*, (2008) encontraron un valor de EC_{50} para *P. infestans* con Ridomil® de $4,86 \mu\text{g.mL}^{-1}$, muy similar al encontrado en esta investigación, lo que significa que el procedimiento y datos obtenidos son confiables, sin embargo se destaca que se utilizan diferentes metodologías y cepas mayor o menor resistencia.

Los resultados obtenidos evidencian que al aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides* Kunth) del Alto Patía tiene un efecto inhibitorio muy importante contra el fitopatógeno *P. infestans*, ya que como se muestra en la Fig. 9, desde la dosis mínima probada de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ se presentó un porcentaje de inhibición de 41,6% (Cuadro 45) en el desarrollo del patógeno y a partir de una concentración de $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$ se inhibió completamente su crecimiento, por lo cual se considera que es la concentración letal para este ensayo.

Varios estudios han demostrado la actividad antifúngica para especies del género *Lippia*, ricas en compuestos fenólicos como el timol y carvacrol. Este es el caso de *L. sidoides*, *L. gracilis* (Lemos *et al.*, 1990), *L. graveolens* (Salgueiro *et al.*, 2003), *L. chevalieri*, *L. multiflora* (Bassole *et al.*, 2003) y *L. origanoides* (Santos *et al.*, 2004). Por lo tanto, los resultados de ésta investigación se atribuye al efecto inhibitorio que presenta el aceite de orégano sobre *P. infestans* al alto contenido de

timol (73% en las muestras utilizadas), ya que este compuesto tiene una comprobada acción antimicrobiana (Braga *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2005).

Se han encontrado evidencias en donde se ha evaluado el aceite de orégano de cualquier especie contra el crecimiento de *P. infestans*, que al ser comparadas con los resultados de ésta investigación se encuentra que los resultados son similares, por ejemplo Krolow *et al.*, (2006), evaluaron la actividad antifúngica del aceite de orégano (*Origanum vulgare*) contra el patógeno *P. infestans* encontrando que en $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ se redujo el crecimiento en un 59,84%, comparando con los datos de esta investigación se tiene que el aceite esencial de orégano silvestre (*L. organoides* Kunth) del Alto Patía, tiene un efecto similar sobre este patógeno dado que en esta misma concentración ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) se logra un porcentaje de inhibición del 53,6% (Cuadro45).

Otro estudio realizado en México sobre el crecimiento micelial muestran el efecto del extracto de orégano (*Origanum mejorana* L.) sobre *P. infestans*, junto con los extractos de otras plantas como hojaseén (*Flourensia cernua* D.C) y trompetilla (*Bouvardia ternifolia* Schlecht). Los resultados muestran que en el extracto de *O. mejorana* tiene un efecto inhibitor del 100% a 8000ppm desde las 48 horas, también que desde la dosis de 8000 a 20000ppm tiene un efecto similar al del metalaxyl. El tratamiento realizado con el extracto de *F. cernula* a 20000ppm presentó un menor efecto ya que el patógeno sobrevivió a esta dosis siendo inhibido el crecimiento micelial en un 67% con respecto al testigo, a estas mismas concentraciones el extracto de *B. ternifolia* inhibió el crecimiento micelial en 34,9% siendo menos eficaz. (Gamboa *et al.*, 2003). En síntesis, los resultados demuestran que los extractos de orégano son más eficientes para controlar el patógeno *P. infestans*, frente a otros extractos vegetales, Gamboa *et al.*, lograron una inhibición del 100% al utilizar una concentración de extracto de orégano de 8000ppm, mientras que en esta investigación con $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$ se alcanza el mismo porcentaje de inhibición, la diferencia radica en que en el extracto metanólico los compuestos no están concentrados en cambio en el aceite esencial si, y se destaca que son diferentes variedades de orégano.

También se han realizados estudios en donde se evaluó extractos de cardon lefaria (*Cereus deficiens*) sobre el crecimiento de 10 patógenos dentro de los cuales se encuentra *P. infestans*, los resultados obtenidos muestran que este extracto tienen un alto poder inhibitor de este patógeno puesto que en las dosis mínima utilizada 25% (v/v) alcanza un porcentaje de inhibición de 85,74% y 86,30% para los extractos etanólicos desgrasado y sin desgrasar respectivamente. También presentaron una CE_{50} de 14,6 y 14,8% Para los extractos etanólicos desgrasado y sin desgrasar respectivamente (Zapata *et al.*, 2003). Al comparar los resultados con los obtenidos en esta investigación se evidencia que el aceite esencial de *L. organoides* Kunth tiene un mayor efecto inhibitor sobre este

patógeno, puesto que la dosis que necesita para reducir el crecimiento de *P. infestans* en 50% es de 20,53 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ o 0,0021% (v/v) la cual es mucho menor que la CE_{50} del extracto de *Cereus deficiens* en sus diferentes extractos.

Los estudios demuestran que el aceite *L. origanoides* es un importante agente inhibidor del crecimiento de diferentes patógenos, entre ellos se puede destacar la investigación en la cual se evaluó el efecto de tres extractos de plantas silvestres entre ellos se encuentra el extracto de *L. origanoides* contra *Rhizoctonia solani* y *Bipolaris maydis* causantes de la mancha sureña del maíz, donde los resultados muestran que *L. origanoides* fue efectivo contra ambos hongos, en una concentración desde 1,5% (v/v) o 14319 ppm causó una inhibición total en los patógenos, y en una concentración de 0,5% (v/v) o 4773 ppm la reducción fue del 70 y 84% en *R. solani* y *B. maydis*, respectivamente (Rodríguez *et al.*, 2005). Comparando estos resultados con los de esta investigación se evidencia que el aceite de *L. origanoides* posee actividad antifúngica más relevante contra *P. infestans*, puesto que en 150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ se inhibe totalmente su crecimiento; esto indica que *P. infestans* es más sensible a los compuestos de *L. origanoides*. Además esta diferencia también podría deberse a que los compuestos fenólicos a los cuales se les atribuye la actividad antifúngica no estén en la misma proporción dado que Rodríguez *et al.*, utilizaron extracto etanólico y no su aceite esencial en donde estos se encuentran más concentrados.

Los resultados obtenidos en este estudio son comparables con los obtenidos por García *et al.*, (2006) quienes evaluaron la actividad antifúngica del aceite de orégano (*Origanum vulgare*) sobre el hongo *Aspergillus flavus*, el cual presentó una inhibición completa con una concentración de 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y una dosis mínima fungicida de 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Teniendo en cuenta la comparación de los resultados de esta investigación con la de otros autores se destaca que la actividad antifúngica del aceite esencial del orégano *L. origanoides* Kunth, es superior a la de otros tipos de extractos vegetales tales como metanólicos y etanólicos; en donde el tipo de disolvente y el método empleado influye en la cantidad de sustancias activas dentro de la composición química del extracto, por tanto, se puede decir que con el método empleado para la obtención del aceite de orégano se logra extraer un alto porcentaje de sustancia activa principal (timol 73,698%), a la cual se le atribuye sus propiedades antifúngicas; así mismo, se obtienen otros compuestos que actúan sinérgicamente en la misma función (-cimeno 10,509%, mirceno 3,095% y -terpineno 2,914%).

7 CONCLUSIONES

- Las pruebas de antioxidantes realizadas con el aceite de orégano de la especie *L. origanoides* mediante los ensayos de DPPH• y ABTS•+ dan como resultados que este aceite tiene una alta capacidad de captura de radicales, ya que en ambos ensayos al compararlo con los patrones estándar como el BHA y BHT dio mejores resultados. La inhibición del radical libre en el ensayo de DPPH• alcanza el 71,6% y en ABTS•+ alcanza 94,34% en las concentraciones más altas evaluadas, únicamente lo supera la actividad antioxidante del ácido ascórbico.
- La muestra evaluada del aceite de orégano de la especie *L. origanoides* presenta un uso potencial como controlador del tizón tardío o gota causada por *P. infestans* debido a la fuerte actividad inhibitoria presentada; ya que a partir de una concentración de 150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ se inhibió completamente el crecimiento del patógeno.
- Aunque los datos obtenidos de $\text{CE}_{50} = 4,73 \mu\text{g.mL}^{-1}$ con el Ridomil® (Metalaxyl + Mancozeb), son mejores que el $\text{CE}_{50} = 22,53 \mu\text{g.mL}^{-1}$ con el aceite de orégano, la ventaja que tiene este último es que al ser un producto totalmente natural no genera daños para el medio ambiente ni poblaciones resistentes de *P. infestans* al metalaxyl.

8. RECOMENDACIONES

- Los resultados de actividad antioxidante sugieren el aceite esencial de orégano puede jugar un papel importante en la reducción del daño oxidativo en algunos alimentos; sin embargo, no hay evidencia científica como tal que corrobore lo anteriormente expuesto, por lo tanto, se recomienda realizar estudios en matrices alimenticias sobre el efecto inhibitorio de estos extractos contra el daño oxidativo.
- Evaluar en campo la actividad antifúngica del aceite de orégano *L. origanoides*, para estudiar la incidencia y severidad de la acción de sus compuestos volátiles frente al tizón tardío causada por *P. infestans*.
- Evaluar la actividad antioxidante del extracto fenólico de orégano *L. origanoides* Kunth dado que en el estudio de Correa 2006, concluye que el extracto fenólico de la pimienta rosa resulta tener mayor eficiencia en la actividad antioxidante que el aceite esencial de la misma planta.

BIBLIOGRAFÍA

ACEVEDO, A., KOUZNETSOV, V., STASHENKO, E. Composición y capacidad antioxidante in- vitro de aceites esenciales ricos en Timol, Carvacrol, trans-anetol o estargol. Revista UIS vol. 41 N° 3, 2009.

AGRIOS, G. Fitopatología. 2ª ed. México: Limusa, 2002.838 p.

ALVAREZ, V. OSPINA, O. TORRES, H. SÁNCHEZ, M.; Evaluación de la actividad inhibitoria de aceites esenciales de *Lippia origanoides* H.B.K. Sobre el desarrollo micelial y la formación de esclerocios de *Sclerotium Cepivorum* Berk Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, Palmira, Colombia, 2007.

ALZATE, Diego, MIER, Gonzalo, AFANADOR, Lucia, DURANGO, Diego, GARCIA, Carlos. Evaluación de la Fototoxicidad y la actividad Antifúngica contra *Colletotrichum acutatum* de los aceites esenciales de Tomillo (*Thymus vulgaris*), limoncillo (*Cymbopogon citratus*), y sus componentes mayoritarios. VITAE, REVISTA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA. ISSN 0121-4004 Volumen 16 número 1, año 2009. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, 2008. 116-125 p.

AMES, SN, SHIGRENAGA, MK, HAGEN, TM. Oxidants, antioxidants and degenerative diseases of aging. Proc Natl Sci USA; (90): 1993. 7915-7922 p.

ARCILA, Cynthia Cristina, LOARCA, Guadalupe, LECONA, Salvador, GONZALES, Elvira. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. Archivo Latinoamericanos de Nutrición. Orégano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición. 2004

BASSOLE, N., QUATTARA, S., NEBIE, R., QUATTARA, AT., ABORE, I., y TRAORE, A. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. Phytochemistry, 2003. 62, 209–212 p.

BOTSGLOU, N YANNAKOPOULOS, A, FLETOURIS, D TSERVENI-GOUSSI, A, FORTOMARIS, P. Effect of dietary thyme on oxidative stability of egg yolk. Journal Agric. Food Chem. 1997.

BRAGA, C., ALFIERIM, CULICI, M., DAL SASSO, M. Inhibitory activity of thymol against the formation and viability of *Candida albicans* hyphae. *Mycoses* 50 (6) 2007. 502–506 p.

BRAND- Williams W, Cuvelier M E and Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity' *Lebensm-Wiss .u-Technol.* 1995.

CARHUAPOMA, Mario, BONILLA, Pablo, SUAREZ, Silvia, VILA, LOPEZ, Sofía. Estudio de la Composición Química y Actividad antioxidante del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray "arrayán". *Ciencia e investigación*, 8 (2) Facultad de Farmacia y bioquímica UNMSM. 2005.

CARVALHO, Julio César Wallwitz. Níveis de luz e homeopatia sobre caracteres morfofisiológicos e óleo essencial e atividade fungitóxica do óleo essencial de *Aloysia gratissima* (Gilles y Hook.). Tronc. Universidad Federal de Lavras UFLA, 2005. 100p.

CASTAÑEDA, M., Muñoz, A., STASHENKO, E. Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas. *Scientia et Technica.* 2007. 33 p.

CAVERO MATÍAS, Sofía. Obtención de Extractos de Plantas Aromáticas Mediante Fluidos Subcríticos y Supercríticos. Caracterización Química y Funcional. Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Departamento de Química Física Aplicada. 2003.

CELIS, Natalia, ESCOBAR, Patricia, ISAZA, José, STASHENKO, Elena, MARTÍNEZ, Jairo. Estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de *Lippia alba*, *Lippia origanoides* y *phyla (Lippia) dulcis*, especies de la familia *Verbenaceae*. *Scientia Et Technica*, abril, año/vol. XIII, número 033. Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira, Colombia, 2007. 103-105 p.

CHAQUILLA, Q., TORREZ, M., BALLINAS, C., GASTÉLUM, F., SILVA, V., NEVÁREZ-M. Actividad antioxidante del aceite esencial del Orégano Mexicano (*Lippia Berlardieri* Schauer) en Sistemas Alimenticios. 3era Reunión Nacional Sobre Orégano, 22 a 24 de Agosto de; Saltillo, Coah., México. Edición especial No. 1. 2007.

CORREA, Michele. Atividade Antioxidante *in vitro* da Fração Fenólica, das Oleorresinas e do Óleo Essencial de Pimenta Rosa (*Schinus terebinthifolius Raddi*). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Brasil. 2006.

DA CUNHA N, Cristina. Caracterização Físico-Química e Atividade Antifúngica dos Óleos Essenciais da Cúrcuma. Faculdade de Farmácia da UFMG Belo Horizonte, MG. 2006.

DELGADO, Y, BÁEZ, J.G, NÚÑEZ, M., GARCÍA, L. AMAYA, A. Y PIMENTEL, J.. Determinación de la Actividad Antioxidante del Aceite Esencial De Orégano (*Poliomintha longiflora* Gray). XII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Guanajuato, Gto. División Ciencias de la Vida. CAMPUS IRAPUATO-Salamanca. 2010

Di MATTEO, V, ESPÓSITO, E. Biochemical and therapeutic effects of antioxidants in the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. *Current Drug Targets CNS y Neurological Disorders*; (2): 2003. 95-107 p.

DOS SANTOS, F.J., LOPES, J.A., CITO, G.L. Composition and Biological Activity of Essential Oils from *Lippia origanoides* H.B.K. *J. Essen. Oil Res.* 2004.

FLEISHER, A. y SNEER, N. Oregano spices and Origanum chemotypes. *Journal Science Food Agriculture*, 1982.33, 441–446 p.

FRAG R. TAHA S. Use of some essential oil as natural preservatives for butter. *JAOCS*, 1990.

FRAYRE, S. Efectos de Extractos Vegetales en el Desarrollo de *Phytophthora infestans* en Jitomate. En: Memorias del X Congreso Nacional de Fitopatología. México, Zacatecas, 1993. 52 p.

GAMBOA, Roberto, HERNANDEZ, Francisco, GUERRERO, Eugenio, SANCHEZ, Abies. Inhibición del Crecimiento Micelial de *Rhizoctonia solana* Kuhn y *Phytophthora infestans* Mont. (De Bary) con extractos Vegetales Matanólicos de Hojasén (*Flourensia cernua* D.C), Mejorana (*Origanum majorana* L.) y Trompetilla

(*Bouvardia ternifolia* (Ca.) Schlecht.) Revista Mexicana de Fitopatología, enero-julio, año/vol. 21, numero 001. Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. Ciudad Obregón, México, 2002. 13-18 p.

GARCÍA, A., QUEZADA, Y., MORENO, J., SANCHEZ, G., MORENO, E., PEREZ, M. Actividad Antifúngica de aceites esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) y Orégano (*Origanum Vulgare* L.) y su efecto sobre la producción de Aflatoxinas en Nuez pecanera. Revista Mexicana de Fitopatología, enero-junio, año/vol. 24, numero 001. Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. 2006. 8-12 p.

GARCÍA RÍOS, Alejandro, LEYVA, Miguel Antonio, MARTINEZ, Jairo René, STASHENKO, Elena E. Determinación de la Composición Química y Actividad antioxidante *in vitro* del aceite esencial de *Piper Auritum* Kunth (*piperaceae*) Difundida en la Costa Colombiana". *Scientia et Técnica*, Año XIII, No 33. 2007.

GARCIA-BARRIGA, H.G. Flora Medicinal de Colombia, Botánica Médica. Tomo II. 2ª ed. Bogotá: Tercer Mundo, 1992. 508 p.

GARCÍA, Hibert, MARÍN, Mauricio, JARAMILLO, Sonia y COTES, José Miguel. Sensibilidad de aislamientos colombianos de *Phytophthora infestans* a cuatro fungicidas sistémicos. *Agronomía Colombiana* 26(1), 2008. 47-57 p.

GERBER, M, BOUTRON-RUAULT MC, HERCBERG S, RIBOLI E, SCALBERT A, SIESS MH. Food and cancer: state of the art about the protective effect of fruits and vegetables. *Bull Cancer*; (89): 2002. 293-312 p.

GOREN, A., BILSEL G., BILSEL M. Analysis of essential oil of *Coridothymus capitatus* (L.) and its antibacterial and antifungal activity. *Z.Naturforsch.*, 58c, 2003. 687-690 p.

GRANADA, N. Efecto de once extractos vegetales sobre el tizón tardío causado por *Phytophthora infestans* (Mont de Bary) en papa (*Solanum phureja* Juz. et Buk). *Revista agronomía*. Vol. 10 No. 1-2, 2002.148 p.

HURTADO, A., ARANGO, O. Proyecto de investigación "Extracción, Caracterización y Purificación de aceite esencial de Orégano de Monte",

presentado y aprobado en la Convocatoria de Investigación y Desarrollo Tecnológico de Cadenas Productivas del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Facultad de Ingeniería Agroindustrial, Universidad de Nariño. 2008.

HENAO, L. MEJÍA L. Evaluación del Efecto Antioxidante de Aceites esenciales y Extractos de *Eugenia Caryophyllata*, *Origanum Vulgare* y *Thymus Vulgaris*. Biosalud, Volumen 8, ISSN 1657-9550. 2009. 58 – 70 p.

JARAMILLO, S. Monografía sobre *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. Medellín: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de ciencias agropecuarias, 2004.137 p.

KRIS-ETHERTON PM, HECKER KD, BONANOME A, COVAL SM, BINKOSKI AE, HILPERT KF. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. Am J Med; 113 (Suppl. 9B): 71S-88S. 2002.

KROLOW, V. BAUER, C. COSTA, J. Efeito de óleos essenciais de plantas medicianis no controle de *Phytophthora infestans* em batata. Resumos do I Congresso Brasileiro de Agroecologia Rev. Bras. de Agroecologia/ Vol. 1 No. 1. 2006.

KU UCAN, J Gaspar. Actividad antimicrobiana de extractos de orégano (*Lippia graveolens*) contra microorganismos fitopatógenos. Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Ingeniería Especialidad en Ingeniería de Invernaderos. 2008.

LAGOS, L. Aislamiento y caracterización genética de las poblaciones de *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary en las zonas productoras de papa (*Solanum tuberosum* L.) en el departamento de Nariño. Cali, p.45. Tesis M.Sc (MSc. en Microbiología). Universidad del Valle. 2002.

LAWRENCE, B. M.. The botanical and chemical aspects of oregano. Perfumer and Flavorist, 9, 1984 41–51p.

LEMONS, T. L. G., MATOS, F. J. A., ALENCAR, J. W., CRAVEIRO, A. A., CLARK, A. M., y MCCHESENEY, J. D. Antimicrobial activity of essential oils of brazilian plants. Phytotherapy Research, 4(2), 1990. 82–84 p.

MARTÍNEZ, A. Aceites esenciales, Universidad De Antioquia, Facultad De Química Farmacéutica Medellín. 2003.

MESA Cecilia, MONTIEL Jehidys, MARTÍNEZ Catalina, ZAPATA Bibiana, PINO Nayive, BUENO Juan, STASHENKO Elena. Actividad In Vitro Anti-Canadia y Anti-Aspergillus de aceites esenciales de Plantas de la Familia Piperaceae. *Scientia Et Technica*, abril, año/vol. XIII, número 033 Universidad Tecnológica de Pereira 2007. 247-249 p.

MILLER N J, Rice-Evans C A and Davis M G, A New Method for measuring Antioxidant Activity. *Biochem Soc Trans*. 1993.

MONTOYA, Guillermo, LONDOÑO, Julián, YASSIN, Lina, VASQUEZ, Gloria, ROJAS, Mauricio, RAMIREZ, Robison. Monoterpenos aromáticos timol y carvacrol: aproximaciones de su posible papel en procesos claves de la patología cardiovascular. *Scientia et Technica Año XIII, No 33*. UTP.ISSN 0122-1701. 2007.

MORTON, A. Atlas of Medicinal Plants of Middle America: Bahamas to Yucatan. Charles C. Thomas Publisher Ltd., Springfield, Illinois, 1981. 745-750 p.

MUÑOZ A, Amner, CASTAÑEDA, Martha L, BLANCO, Katerine M, CARDENAS, Carol Y, REYES, Johana A. KOUZNETSOV, Vladimir, STASHENKO, Elena E. "Composición y Capacidad Antioxidante de Especies Aromáticas y Medicinales con Alto Contenido de timol y carvacrol". *Scientia et Técnica*, Año XIII, No 33. 2007.

NAVARRO DIAS, H,J, ALVUQUERQUE, C.L.C., MEIRELES, M.A.A. Actividad antioxidante de Extractos de *Origanum Vulgare* Obtenido con Dióxido de Carbono Supercrítico. LASEFI/DEA/Fea (School of Food Eng.)/UNICAMP (University of Campinas) – R. Monteiro Lobato, 80; 13083-862, Campinas, SP, Brazil. 2007.

O'FARRIL, H. X Congreso universitario de Mayaguez. Universidad de Puerto Rico, Departamento de Protección de Cultivos. 2004.

OLIVEIRA, Danilo, LEITÃO Gilda G. BIZZO Humberto R., LOPES Daí se, ALVIANO Daniela S. ALVIANO Celuta S., LEITÃO Suzana G. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K Departamento de Produtos Naturais e Alimentos, Faculdade de Farmácia – UFRJ, Centro de Ciências da Saúde, Bloco A 2o andar, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, 21941-590, Rio de Janeiro, Brazil. 2005.

PELLEGRINI, PROTEGGENTE, PANNALA, YANG, and Rice- Evans C. Antioxidant activity applying an improved radical cation decolorization assay, *Free Rad Biol Med.* 1999.

PÉREZ W., FORBES G. MANUAL TÉCNICO El tizón tardío de la papa. Centro Internacional de la Papa Apartado 1558, Lima 12, Perú. 2008.cip@cgiar.org - www.cipotato.org

PIMENTEL, Flávio Araújo Avaliação fungitóxica e caracterização química dos óleos essenciais e extratos obtidos após diferentes processos de extração de cipó vick (*Tanaecium nocturnum*) e Joao-brandim (*Piper piscatorum*). Universidad federal de Lavras. UFLA, 2007. 178 p.

POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. *Antioxidants in food: practical applications*. CRC Press, Woodhead Publishing Limited. Cambridge. 2001.

----- “Antioxidants in food preservation”, in: Handbook of Food Preservation, Shafiur Rahman M (ed.), New York, Marcel Dekker, 1999. 309-370p.

PROINPA. 2006. Papa andina: Innovación para el desarrollo en los Andes 2002-2006.

En: www.papandina.cip.cgiar.org/fileadmin/documentpool/Administrativo/Informe/Fase/06-10-11-Compendio_2002_2006.pdf; Consultado: Noviembre 2009.

PUERTAS, M. A.; HILLEBRAND, S.; STASHENKO, E.; WINTERHALTER, P. *In vitro* radical scavenging activity of essential oils from columbian plants and fractions from oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil. *Flavour Fragr. J.* 17, 2002. 380 p.

RE, Roberta, PELLEGRINI, Nicoletta, PROTEGGENTE, Anna, PANNALA, Ananth, YANG, Min, and RICE-EVANS, Catherine. Antioxidant Activity Applying An Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. International Antioxidant.

Research Centre, Guy's, King's and St Thomas' School of Biomedical Sciences, Kings College–Guy's Campus, London SE1 9RT, UK. Vol. 26, Nos. 9/10, 1999. 1231–1237 p.

RIVEROS, F., SOTOMAYOR, R., RIVERA, V., SECOR, G. y ESPINOZA, B. Resistencia de *phytophthora infestans* (montagne) de bary a metalaxil, en cultivo de papas en el Norte de Chile. *Agric. Téc.* 2003.

RODRIGUEZ, A. Vademécum del cultivo de la papa. Bogotá, Colombia, Grafemas Ltda. 1996.172 p.

RODRIGUEZ, Dorian A y SANABRIA, María E. Efecto del extracto de tres plantas silvestres sobre la rizoctoniosis, la mancha sureña del maíz y los patógenos que las causan. *INCI*, dic., vol.30, no.12, p.739-744. ISSN 0378-1844. 2005

ROURA I. Sara. Extractos vegetales: Propiedades antimicrobianas y sus aplicaciones en alimentos. 2003.

RUIZ, C., TUNAROSA, F., MARTINEZ, J., STASHENKO, E. Estudio comparativo por gc-ms de metabolitos secundarios volátiles de dos quimiotipos de *Lippia origanoides* H.B.K., obtenidos por diferentes técnicas de extracción. *Scientia et Technica*. 33: 2007. 325-328 p.

SALGUEIRO, L. R., CAVALEIRO, C., GONÇALVES, M. J., y CUNHA, A. P. Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Lippia graveolens* from Guatemala. *Planta Medica*, 2003. 69, 80–83p.

SANTOS, F. J. B., LOPES, J. A. D., CITO, A. M. G. L., OLIVEIRA, E. H., LIMA, S. G., y REIS, F. A. M. Composition and biological activity of essential oils from *Lippia organoides* H.B.K. *Journal of Essential Oil Research*, 2004. 16, 504–506 p.

SERAFINI M, BELLOCO R, WOLK A, EKSTROM AM. Total antioxidant potential of fruit and vegetables and risk of gastric cancer. *Gastroenterology*; (123): 2002. 985-991 p.

SHATTOCK, R. Studies on the inheritance of resistance to Metalaxyl in *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology*, 1998. 4-11 p.

SIMIC, MG. Free Radical Mechanism of autoxidation process, *J Chem Educ.* 1981.

Syngenta S.A. <http://www.florintegral.com.co/producto.php?opcion=0035ycualinfo>

TAFURT G, Giovanna, MARTINEZ, Jario R, STASHENKO, Elena E. "Evaluación de la Actividad antioxidante de aceites esenciales en Emulsiones Degradadas por Radiación Ultravioleta". *Revista Colombiana de Química*, Volumen 34, No. 1. 2005.

TINOCO M. T., MARTINS M. R. y CRUZ-MORAIS J. Actividade antimicrobiana do óleo essencial do *Foeniculum vulgare* Millar. 2006.

TIPSRISUKOND N., CLARKE A.D. Antioxidant effects of essential oil and oleoresin of black pepper from supercritical carbon dioxide extractions in ground pork. *Journal Agric Food Chem.* 1998.

TORREZ, H. Principales enfermedades fungosas de la papa relacionadas con la producción de tubérculos semillas. Centro internacional de la papa (CIP) Fasc. 1997. 3.3, 37 p.

TUCKER, A. O., y MACIARELLO, M. J. Oregano: botany, chemistry, and cultivation. In G. Charalambous (Ed.), *Spices, herbs and edible fungi*. Amsterdam: Elsevier Science B.V. 1994. 439–456 p.

URSINI, F.; TUBARO, F.; RAPUZZI, P.; ZAMBURLINI, A.; MAIORINO, M. Wine antioxidants: Effects in vitro and in vivo. *Wine and Human Health*, Udine 9-11, 1996.

VARGAS Adriana, BOTTIA Edwin J. Estudio de la composición química de los aceites esenciales de seis especies vegetales cultivadas en los municipios de Bolívar y el peñón – Santander, Colombia. Universidad Industrial de Santander Facultad de ciencias Escuela de Química. 2008.

VARGAS, Arispur. Actividad antioxidante de Compuestos Aislados del Residuo no Volátil del aceite esencial de Naranja. Disponible en <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheNycpsidt=2440546>. Consulta octubre. 2009.

VERNIN, G.; LAGEOT, C.; GAYDOU, E.. Analysis of the essential oil of *Lippia graveolens* HBK from El Salvador, *Flav. Fragr. J.*; 16, 2001 219–226 p.

ZABALETA, M. Alternativas de manejo de las enfermedades de las plantas. México, Terra, Vol. 17 No. 3, 2000.23 – 26 p.

ZAPATA R, SANABRIA M, RODRIGUEZ D, Reducción del desarrollo de hongos fitopatogenos com extracto de Cardón lefaria (cereus deficiens Otto & diert) . Interciencia mayo, año/vol. 28 número 005 Caracas- Venezuela. 2003. 302-306 p

ZEGARSKA, Z, AMAROWIEZ, R, KARMAK, M, RAFALOWSKI, R. Antioxidative effect of rosmary ethanolic extract on butter. *Milchwissenschaft*. 1996.

ANEXOS

ANEXO A

Primer ensayo de DPPH• con aceite de orégano.

Aceite de Orégano (11,9- 190,9mg/mL)

Absorbancia

Tiempo	Concentración de aceite de orégano (mg/mL)					
	11,9325	47,73	83,5275	119,325	155,122	190,92
0	0,696	0,708	0,648	0,645	0,633	0,634
5	0,613	0,616	0,588	0,516	0,483	0,501
10	0,391	0,328	0,242	0,146	0,135	0,084
15	0,299	0,174	0,160	0,120	0,116	0,084
20	0,265	0,149	0,124	0,105	0,098	0,083
25	0,243	0,144	0,116	0,107	0,097	0,080
30	0,225	0,143	0,115	0,105	0,085	0,070
35	0,191	0,142	0,115	0,097	0,085	0,070
40	0,167	0,142	0,115	0,097	0,085	0,070
45	0,157	0,142	0,115	0,097	0,085	0,070
50	0,153	0,142	0,115	0,097	0,085	0,070
55	0,153	0,142	0,115	0,097	0,085	0,070
60	0,153	0,142	0,115	0,097	0,085	0,070

Concentración de DPPH• en el Medio (mg/mL)

Tiempo	Concentración de aceite de orégano (mg/mL)					
	11,9325	47,73	83,5275	119,325	155,122	190,92
0	0,028	0,028	0,026	0,026	0,025	0,025
5	0,024	0,025	0,023	0,020	0,019	0,020
10	0,015	0,013	0,009	0,005	0,005	0,003
15	0,012	0,006	0,006	0,004	0,004	0,003
20	0,010	0,005	0,004	0,004	0,003	0,003
25	0,009	0,005	0,004	0,004	0,003	0,003
30	0,009	0,005	0,004	0,004	0,003	0,002
35	0,007	0,005	0,004	0,003	0,003	0,002
40	0,006	0,005	0,004	0,003	0,003	0,002

Anexo A. Concentración de DPPH• en el Medio (mg/mL) (continuación)

Tiempo	Concentración de aceite de orégano (mg/mL)					
	11,9325	47,73	83,5275	119,325	155,122	190,92
45	0,006	0,005	0,004	0,003	0,003	0,002
50	0,006	0,005	0,004	0,003	0,003	0,002
55	0,006	0,005	0,004	0,003	0,003	0,002
60	0,006	0,005	0,004	0,003	0,003	0,002

%DPPH•rem

Tiempo	Concentración de aceite de orégano (mg/mL)					
	11,9325	47,73	83,5275	119,325	155,122	190,92
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
5	87,98	86,91	90,64	80,00	76,08	78,78
10	55,81	45,76	36,66	22,58	20,49	12,29
15	42,41	23,86	23,91	18,55	17,45	12,21
20	37,51	20,26	18,17	16,28	14,58	12,17
25	34,24	19,58	16,93	16,54	14,34	11,57
30	31,66	19,40	16,83	16,33	12,42	10,09
35	26,69	19,29	16,81	15,04	12,46	10,09
40	23,24	19,26	16,81	15,04	12,46	10,09
45	21,75	19,26	16,81	15,04	12,46	10,09
50	21,24	19,26	16,81	15,04	12,46	10,09
55	21,24	19,26	16,81	15,04	12,46	10,09
60	21,24	19,26	16,81	15,04	12,46	10,09

% Inhibición

Tiempo	Concentración de aceite de orégano (mg/mL)					
	11,9325	47,73	83,5275	119,325	155,122	190,92
0	11,897	12,959	9,259	20,000	23,657	20,986
5	43,745	53,707	62,654	77,416	78,633	86,745
10	57,009	75,388	75,270	81,447	81,635	86,824
15	61,862	78,954	80,941	83,720	84,478	86,863
20	65,097	79,625	82,175	83,462	84,715	87,455
25	67,649	79,802	82,268	83,669	86,611	88,915
30	72,573	79,908	82,291	84,961	86,571	88,915
35	75,988	79,943	82,291	84,961	86,571	88,915
40	77,462	79,943	82,291	84,961	86,571	88,915
45	77,965	79,943	82,291	84,961	86,571	88,915
50	77,965	79,943	82,291	84,961	86,571	88,915
55	77,965	79,943	82,291	84,961	86,571	88,915

ANEXO B

Segundo ensayo de DPPH• con aceite de orégano.

Aceite de Orégano (0,1- 8,9mg/mL)

Absorbancia

Tiempo	Concentración de aceite de orégano (mg/mL)			
	0,10	3,05	6,01	8,97
0	0,958	0,950	0,955	0,960
5	0,881	0,945	0,938	0,766
10	0,875	0,773	0,760	0,594
15	0,870	0,767	0,628	0,345
20	0,866	0,761	0,602	0,229
25	0,867	0,749	0,578	0,147
30	0,866	0,737	0,553	0,124
35	0,866	0,727	0,545	0,122
40	0,865	0,717	0,532	0,118
45	0,865	0,709	0,521	0,116
50	0,864	0,700	0,510	0,113
55	0,863	0,690	0,499	0,110
60	0,862	0,683	0,490	0,108
65	0,861	0,676	0,481	0,106
70	0,860	0,669	0,473	0,104
75	0,859	0,666	0,462	0,102
80	0,858	0,656	0,457	0,101
85	0,857	0,650	0,450	0,099
90	0,856	0,643	0,439	0,097
95	0,855	0,637	0,432	0,096
100	0,854	0,632	0,423	0,094
105	0,853	0,627	0,418	0,093
110	0,852	0,621	0,405	0,092
115	0,851	0,616	0,392	0,091
120	0,850	0,611	0,379	0,090
125	0,850	0,601	0,350	0,087
130	0,840	0,630	0,450	0,272

Concentración de DPPH• en el Medio (mg/mL)

Tiempo	Concentración de aceite de orégano (mg/mL)			
	0,10	3,05	6,01	8,97
0	0,039	0,0388	0,0390	0,0392
5	0,036	0,0386	0,0383	0,0312
10	0,035	0,0315	0,0310	0,0242
15	0,035	0,0313	0,0256	0,0221
20	0,035	0,0310	0,0245	0,0180
25	0,035	0,0305	0,0235	0,0162
30	0,0354	0,0300	0,0225	0,0160
35	0,0354	0,0296	0,0221	0,0140
40	0,0353	0,0292	0,0216	0,0132
45	0,0353	0,0289	0,0212	0,0130
50	0,0353	0,0285	0,0207	0,0128
55	0,0352	0,0281	0,0202	0,0127
60	0,0352	0,0278	0,0199	0,0126
65	0,0351	0,0275	0,0195	0,0122
70	0,0351	0,0272	0,0192	0,0120
75	0,0351	0,0271	0,0187	0,0116
80	0,0350	0,0267	0,0185	0,0109
85	0,0350	0,0265	0,0182	0,0109
90	0,0349	0,0262	0,0182	0,0109
95	0,0349	0,0259	0,0182	0,0109
100	0,0349	0,0258	0,0182	0,0109
105	0,0348	0,0256	0,0182	0,0109
110	0,0347	0,0256	0,0182	0,0109
115	0,0343	0,0256	0,0182	0,0109
120	0,0343	0,0256	0,0182	0,0109
125	0,0343	0,0256	0,0182	0,0109
130	0,0343	0,0256	0,0182	0,0109

%DPPH•rem

Tiempo	Concentración de aceite de orégano (mg/mL)			
	0,10	3,05	6,01	8,97
0	100,00	100,00	100,00	100,00
5	91,90	99,47	98,21	79,64
10	91,27	81,23	79,43	61,59
15	90,75	80,59	65,51	56,45
20	90,33	79,96	62,76	45,96
25	90,43	78,69	60,23	41,24
30	90,33	77,41	57,59	40,71
35	90,33	76,35	56,75	35,68

Anexo B. %DPPH•rem (continuación)

Tiempo	Concentración de aceite de orégano (mg/mL)			
	0,10	3,05	6,01	8,97
40	90,22	75,29	55,38	33,58
45	90,22	74,44	54,22	33,05
50	90,12	73,49	53,06	32,63
55	90,01	72,43	51,90	32,42
60	89,91	71,69	50,95	32,11
65	89,80	70,94	50,00	31,16
70	89,70	70,20	49,16	30,64
75	89,59	69,88	48,00	29,59
80	89,48	68,82	47,47	27,81
85	89,38	68,19	46,73	27,81
90	89,27	67,44	46,73	27,81
95	89,17	66,81	46,73	27,81
100	89,06	66,60	46,73	27,81
105	88,96	66,07	46,73	27,81
110	88,64	66,07	46,73	27,81
115	87,59	66,07	46,73	27,81
120	87,59	66,07	46,73	27,81
125	87,59	66,07	46,73	27,81
130	87,59	66,07	46,73	27,81

% Inhibición

Tiempo	Concentración de aceite de orégano (mg/mL)			
	0,10	3,05	6,01	8,97
0	8,037	0,5263	1,780	20,208
5	8,663	18,631	20,418	38,125
10	9,185	19,263	34,240	64,062
15	9,603	19,894	36,963	76,145
20	9,499	21,157	39,476	84,687
25	9,603	22,421	42,094	87,083
30	9,603	23,473	42,931	87,291
35	9,707	24,526	44,293	87,708
40	9,707	25,368	45,445	87,916
45	9,812	26,315	46,596	88,229
50	9,916	27,368	47,748	88,541
55	10,020	28,105	48,691	88,750
60	10,125	28,842	49,633	88,958
65	10,229	29,578	50,471	89,166
70	10,334	29,894	51,623	89,375
75	10,438	30,947	52,146	89,479

Anexo B. % Inhibición (continuación)

Tiempo	Concentración de aceite de orégano (mg/mL)			
	0,10	3,05	6,01	8,97
80	10,542	31,578	52,879	89,687
85	10,647	32,315	54,031	89,895
90	10,751	32,947	54,764	90,000
95	10,855	33,473	55,706	90,208
100	10,960	34,000	56,230	90,312
105	11,064	34,631	57,591	90,416
110	11,169	35,157	58,952	90,520
115	11,273	35,684	60,314	90,625
120	11,273	36,736	63,350	90,937
125	12,317	33,684	52,879	71,666

ANEXO C

Ensayo de DPPH• con ácido ascórbico.

Absorbancia

Tiempo	Concentración de ácido ascórbico (mg/mL)			
	0,0085	0,014	0,039	0,102
0	0,596	0,580	0,576	0,582
5	0,483	0,521	0,488	0,355
10	0,445	0,472	0,454	0,317
15	0,442	0,467	0,450	0,261
20	0,440	0,461	0,410	0,241
25	0,438	0,459	0,405	0,222
30	0,436	0,458	0,402	0,179
35	0,433	0,457	0,400	0,166
40	0,432	0,455	0,397	0,156
45	0,430	0,452	0,394	0,145
50	0,429	0,450	0,391	0,136
55	0,427	0,447	0,387	0,124
60	0,426	0,443	0,385	0,115
65	0,425	0,441	0,380	0,105
70	0,423	0,438	0,377	0,094
75	0,422	0,436	0,370	0,078
80	0,421	0,432	0,365	0,065
85	0,420	0,429	0,360	0,054
90	0,418	0,426	0,355	0,043
95	0,417	0,424	0,349	0,043
100	0,415	0,422	0,343	0,043
105	0,414	0,420	0,335	
110	0,412	0,418	0,332	
115	0,411	0,415	0,327	
120	0,410	0,413	0,322	
125	0,408	0,410	0,317	
130	0,406	0,408	0,311	
135	0,405	0,405	0,305	
140	0,403	0,403	0,299	
145	0,402	0,400	0,298	
150	0,400	0,398	0,288	
155	0,399	0,395	0,282	
160	0,397	0,394	0,280	
165	0,396	0,390	0,276	
170	0,394	0,388	0,271	
175	0,393	0,386	0,268	
180	0,392	0,384	0,263	

185	0,390	0,381	0,259	
-----	-------	-------	-------	--

Anexo C. Absorbancia (continuación)

Tiempo	Concentración de ácido ascórbico (mg/mL)			
	0,0085	0,014	0,039	0,102
190	0,390	0,380	0,253	
195	0,388	0,378	0,249	
200	0,387	0,375	0,244	
205	0,386	0,373	0,239	
210	0,385	0,371	0,234	
215	0,383	0,368	0,230	
220	0,382	0,367	0,225	
225	0,381	0,365	0,221	
230	0,380	0,363	0,216	
235	0,378	0,362	0,213	
240	0,377	0,359	0,213	
245	0,375	0,357		
250	0,374	0,354		
255	0,372	0,352		
260	0,371	0,349		
265	0,369	0,347		
270	0,368	0,344		
275	0,366	0,342		
280	0,364	0,340		
285	0,362	0,338		
290	0,361	0,336		
295	0,359	0,335		
300	0,358	0,333		
305	0,356	0,331		
310	0,354	0,329		
315	0,352	0,327		
320	0,350	0,325		
325	0,348	0,323		
330	0,347	0,322		
335	0,345	0,320		
340	0,343	0,318		
345	0,342	0,317		
350	0,340	0,315		
355	0,339	0,314		
360	0,337	0,312		
365	0,336	0,310		
370	0,334	0,309		
375	0,333	0,308		
380	0,331	0,306		
385	0,330	0,305		
390	0,329	0,303		

395	0,328	0,301		
-----	-------	-------	--	--

Anexo C. Absorbancia (continuación)

Tiempo	Concentración de ácido ascórbico (mg/mL)			
	0,0085	0,014	0,039	0,102
400	0,327	0,299		
405	0,325	0,297		
410	0,324	0,295		
415	0,323	0,294		
420	0,322	0,291		
425	0,321	0,289		
430	0,319	0,288		
435	0,318	0,287		
440	0,317	0,286		
445	0,315	0,285		
450	0,314	0,285		
455	0,313	0,284		
460	0,312	0,284		
465	0,311	0,284		
470	0,311			
475	0,311			
480	0,311			

Concentración DPPH• en el Medio (mg/mL)

Tiempo	Concentración de ácido ascórbico (mg/mL)			
	0,0085	0,014	0,039	0,102
0	0,062	0,060	0,060	0,061
5	0,050	0,054	0,051	0,037
10	0,046	0,049	0,047	0,033
15	0,046	0,049	0,047	0,027
20	0,046	0,048	0,043	0,025
25	0,046	0,048	0,042	0,023
30	0,045	0,048	0,042	0,019
35	0,045	0,048	0,042	0,017
40	0,045	0,047	0,041	0,016
45	0,045	0,047	0,041	0,015
50	0,045	0,047	0,041	0,014
55	0,045	0,047	0,040	0,013
60	0,044	0,046	0,040	0,012
65	0,044	0,046	0,040	0,011
70	0,044	0,046	0,039	0,010
75	0,044	0,045	0,039	0,008
80	0,044	0,045	0,038	0,007
85	0,044	0,045	0,037	0,006
90	0,044	0,044	0,037	0,004

95	0,043	0,044	0,036	0,004
----	-------	-------	-------	-------

Anexo C. Concentración DPPH• en el Medio (mg/mL) (continuación)

Tiempo	Concentración de ácido ascórbico (mg/mL)			
	0,0085	0,014	0,039	0,102
100	0,043	0,044	0,036	0,004
105	0,043	0,044	0,035	
110	0,043	0,044	0,035	
115	0,043	0,043	0,034	
120	0,043	0,043	0,034	
125	0,042	0,043	0,033	
130	0,042	0,042	0,032	
135	0,042	0,042	0,032	
140	0,042	0,042	0,031	
145	0,042	0,042	0,031	
150	0,042	0,041	0,030	
155	0,042	0,041	0,029	
160	0,041	0,041	0,029	
165	0,041	0,041	0,029	
170	0,041	0,040	0,028	
175	0,041	0,040	0,028	
180	0,041	0,040	0,027	
185	0,041	0,040	0,027	
190	0,041	0,040	0,026	
195	0,040	0,039	0,026	
200	0,040	0,039	0,025	
205	0,040	0,039	0,025	
210	0,040	0,039	0,024	
215	0,040	0,038	0,024	
220	0,040	0,038	0,023	
225	0,040	0,038	0,023	
230	0,040	0,038	0,022	
235	0,039	0,038	0,022	
240	0,039	0,037	0,022	
245	0,039	0,037		
250	0,039	0,037		
255	0,039	0,037		
260	0,039	0,036		
265	0,038	0,036		
270	0,038	0,036		
275	0,038	0,036		
280	0,038	0,035		
285	0,038	0,035		
290	0,038	0,035		
295	0,037	0,035		
300	0,037	0,035		

305	0,037	0,034		
-----	-------	-------	--	--

Anexo C. Concentración DPPH• en el Medio (mg/mL) (continuación)

Tiempo	Concentración de ácido ascórbico (mg/mL)			
	0,0085	0,014	0,039	0,102
310	0,037	0,034		
315	0,037	0,034		
320	0,037	0,034		
325	0,036	0,034		
330	0,036	0,034		
335	0,036	0,033		
340	0,036	0,033		
345	0,036	0,033		
350	0,035	0,033		
355	0,035	0,033		
360	0,035	0,033		
365	0,035	0,032		
370	0,035	0,032		
375	0,035	0,032		
380	0,035	0,032		
385	0,034	0,032		
390	0,034	0,032		
395	0,034	0,031		
400	0,034	0,031		
405	0,034	0,031		
410	0,034	0,031		
415	0,034	0,031		
420	0,034	0,030		
425	0,033	0,030		
430	0,033	0,030		
435	0,033	0,030		
440	0,033	0,030		
445	0,033	0,030		
450	0,033	0,030		
455	0,033	0,030		
460	0,032	0,030		
465	0,032	0,030		
470	0,032			
475	0,032			
480	0,032			

%DPPH•rem

Tiempo	Concentración de ácido ascórbico (mg/mL)			
	0,0085	0,014	0,039	0,102
0	100	100	100	100
5	81,123	89,817	84,693	60,991
10	74,681	81,302	78,866	54,452
15	74,233	80,440	78,170	44,872
20	73,896	79,462	71,212	41,315
25	73,504	79,174	70,343	38,045
30	73,168	78,944	69,821	30,760
35	72,720	78,771	69,386	28,408
40	72,440	78,426	68,864	26,801
45	72,160	77,908	68,342	24,908
50	71,936	77,505	67,820	23,245
55	71,712	76,988	67,212	21,294
60	71,488	76,412	66,777	19,688
65	71,320	76,010	65,994	17,910
70	71,040	75,549	65,385	16,017
75	70,872	75,089	64,255	13,263
80	70,648	74,456	63,298	11,026
85	70,423	73,939	62,428	9,190
90	70,199	73,478	61,559	7,297
95	69,919	73,133	60,515	7,240
100	69,695	72,673	59,558	7,240
105	69,415	72,328	58,167	
110	69,191	71,983	57,645	
115	68,911	71,522	56,775	
120	68,743	71,120	55,905	
125	68,407	70,659	54,949	
130	68,183	70,257	53,905	
135	67,903	69,854	52,948	
140	67,679	69,394	51,905	
145	67,399	68,991	51,731	
150	67,191	68,531	49,904	
155	66,894	68,070	48,948	
160	66,670	67,840	48,513	
165	66,446	67,207	47,817	
170	66,166	66,862	46,947	
175	65,942	66,575	46,425	
180	65,774	66,172	45,643	
185	65,494	65,712	44,860	
190	65,382	65,482	43,903	
195	65,158	65,079	43,208	
200	64,990	64,676	42,338	

205	64,766	64,273	41,468	
-----	--------	--------	--------	--

Anexo C. %DPPH•rem (continuación)

Tiempo	Concentración de ácido ascórbico (mg/mL)			
	0,0085	0,014	0,039	0,102
210	64,598	63,871	40,598	
215	64,262	63,468	39,816	
220	64,094	63,180	39,033	
225	63,870	62,835	38,250	
230	63,702	62,547	37,380	
235	63,477	62,317	36,946	
240	63,253	61,915	36,946	
245	62,973	61,454		
250	62,749	61,052		
255	62,469	60,591		
260	62,245	60,131		
265	61,965	59,728		
270	61,741	59,326		
275	61,405	58,981		
280	61,125	58,578		
285	60,789	58,233		
290	60,509	57,887		
295	60,229	57,657		
300	60,004	57,370		
305	59,668	57,025		
310	59,388	56,679		
315	59,052	56,334		
320	58,772	55,989		
325	58,436	55,701		
330	58,156	55,414		
335	57,820	55,126		
340	57,540	54,838		
345	57,316	54,551		
350	57,092	54,263		
355	56,812	54,033		
360	56,587	53,745		
365	56,307	53,458		
370	56,083	53,227		
375	55,803	52,997		
380	55,579	52,767		
385	55,355	52,537		
390	55,187	52,192		
395	54,963	51,904		
400	54,795	51,502		
405	54,571	51,214		
410	54,403	50,869		

415	54,235	50,581		
-----	--------	--------	--	--

Anexo C. %DPPH•rem (continuación)

Tiempo	Concentración de ácido ascórbico (mg/mL)			
	0,0085	0,014	0,039	0,102
420	54,011	50,178		
425	53,787	49,833		
430	53,563	49,603		
435	53,339	49,430		
440	53,171	49,315		
445	52,890	49,143		
450	52,610	49,028		
455	52,442	48,970		
460	52,274	48,970		
465	52,218	48,970		
470	52,106			
475	52,106			
480	52,106			

% Inhibición

Tiempo	Concentración de ácido ascórbico (mg/mL)			
	0,0085	0,014	0,039	0,102
0	18,858	10,172	15,291	38,968
5	25,294	18,678	21,112	45,501
10	25,741	19,540	21,807	55,072
15	26,077	20,517	28,758	58,625
20	26,469	20,805	29,626	61,891
25	26,805	21,034	30,148	69,169
30	27,252	21,207	30,582	71,519
35	27,532	21,552	31,103	73,123
40	27,812	22,069	31,625	75,014
45	28,036	22,471	32,146	76,676
50	28,260	22,989	32,754	78,625
55	28,483	23,563	33,189	80,229
60	28,651	23,966	33,970	82,006
65	28,931	24,425	34,579	83,897
70	29,099	24,885	35,708	86,648
75	29,323	25,517	36,664	88,883
80	29,547	26,034	37,533	90,716
85	29,771	26,494	38,401	92,607
90	30,050	26,839	39,444	92,665
95	30,274	27,299	40,400	92,665
100	30,554	27,644	41,790	
105	30,778	27,989	42,311	
110	31,058	28,448	43,180	

115	31,226	28,851	44,049	
-----	--------	--------	--------	--

Anexo C. %Inhibición (continuación)

Tiempo	Concentración de ácido ascórbico (mg/mL)			
	0,0085	0,014	0,039	0,102
120	31,561	29,310	45,004	
125	31,785	29,713	46,047	
130	32,065	30,115	47,003	
135	32,289	30,575	48,045	
140	32,569	30,977	48,219	
145	32,776	31,437	50,043	
150	33,072	31,897	50,999	
155	33,296	32,126	51,434	
160	33,520	32,759	52,129	
165	33,800	33,103	52,997	
170	34,024	33,391	53,519	
175	34,191	33,793	54,301	
180	34,471	34,253	55,083	
185	34,583	34,483	56,038	
190	34,807	34,885	56,733	
195	34,975	35,287	57,602	
200	35,199	35,690	58,471	
205	35,367	36,092	59,340	
210	35,702	36,494	60,122	
215	35,870	36,782	60,904	
220	36,094	37,126	61,685	
225	36,262	37,414	62,554	
230	36,486	37,644	62,989	
235	36,710	38,046	62,989	
240	36,989	38,506		
245	37,213	38,908		
250	37,493	39,368		
255	37,717	39,828		
260	37,997	40,230		
265	38,220	40,632		
270	38,556	40,977		
275	38,836	41,379		
280	39,172	41,724		
285	39,452	42,069		
290	39,731	42,299		
295	39,955	42,586		
300	40,291	42,931		
305	40,571	43,276		
310	40,907	43,621		
315	41,186	43,966		
320	41,522	44,253		

325	41,802	44,540		
-----	--------	--------	--	--

Anexo C. %Inhibición (continuación)

Tiempo	Concentración de ácido ascórbico (mg/mL)			
	0,0085	0,014	0,039	0,102
330	42,138	44,828		
335	42,417	45,115		
340	42,641	45,402		
345	42,865	45,690		
350	43,145	45,920		
355	43,369	46,207		
360	43,649	46,494		
365	43,872	46,724		
370	44,152	46,954		
375	44,376	47,184		
380	44,600	47,414		
385	44,768	47,759		
390	44,992	48,046		
395	45,159	48,448		
400	45,383	48,736		
405	45,551	49,080		
410	45,719	49,368		
415	45,943	49,770		
420	46,167	50,115		
425	46,391	50,345		
430	46,614	50,517		
435	46,782	50,632		
440	47,062	50,805		
445	47,342	50,920		
450	47,510	50,977		
455	47,678	50,977		
460	47,734	50,977		
465	47,846			
470	47,846			
475	47,846			

ANEXO D

Ensayo de DPPH• con BHT.

Absorbancia

Tiempo	Concentración de BHT (mg/mL)			
	0,0019	0,0031	0,0086	0,0225
0	0,982	0,980	0,979	0,977
5	0,955	0,966	0,964	0,968
10	0,949	0,958	0,955	0,961
15	0,947	0,950	0,944	0,948
20	0,945	0,946	0,941	0,944
25	0,943	0,944	0,939	0,939
30	0,943	0,941	0,938	0,936
35	0,941	0,938	0,935	0,933
40	0,936	0,936	0,934	0,925
45	0,936	0,934	0,931	0,925
50	0,936	0,934	0,931	0,925
55	0,936	0,934	0,931	0,925
60	0,936	0,934	0,931	0,925

Concentración de DPPH• en el medio (mg/mL)

Tiempo	Concentración de BHT (mg/mL)			
	0,0019	0,0031	0,0086	0,0225
0	0,040	0,040	0,040	0,040
5	0,039	0,040	0,040	0,040
10	0,039	0,039	0,039	0,040
15	0,039	0,039	0,039	0,039
20	0,039	0,039	0,039	0,039
25	0,039	0,039	0,039	0,039
30	0,039	0,039	0,039	0,038
35	0,039	0,039	0,038	0,038
40	0,038	0,038	0,038	0,038
45	0,038	0,038	0,038	0,038
50	0,038	0,038	0,038	0,038
55	0,038	0,038	0,038	0,038
60	0,038	0,038	0,038	0,038

% DPPH•rem

Tiempo	Concentración de BHT (mg/mL)			
	0,0019	0,0031	0,0086	0,0225
0	100	100	100	100
5	97,249	98,519	98,467	99,027
10	96,586	97,753	97,547	98,361
15	96,433	96,886	96,422	97,030
20	96,179	96,477	96,116	96,569
25	96,026	96,273	95,911	96,108
30	95,975	95,967	95,809	95,749
35	95,771	95,711	95,502	95,442
40	95,261	95,507	95,400	94,623
45	95,261	95,303	95,094	94,623
50	95,312	95,303	95,094	94,623
55	95,312	95,303	95,094	94,623
60	95,312	95,303	95,094	94,623

% Inhibición

Tiempo	Concentración de BHT (mg/mL)			
	0,0019	0,0031	0,0086	0,0225
0	2,749	1,480	1,532	0,972
5	3,411	2,245	2,451	1,638
10	3,564	3,112	3,575	2,968
15	3,819	3,520	3,882	3,429
20	3,971	3,724	4,086	3,889
25	4,022	4,031	4,188	4,248
30	4,226	4,286	4,494	4,555
35	4,735	4,490	4,597	5,374
40	4,735	4,694	4,903	5,374
45	4,684	4,694	4,903	5,374
50	4,684	4,694	4,903	5,374
55	4,684	4,694	4,903	5,374

ANEXO E

Ensayo de DPPH• con BHA.

Absorbancia

Tiempo	Concentración de BHA (mg/mL)			
	0,002	0,003	0,007	0,018
0	0,982	0,984	0,981	0,981
5	0,974	0,977	0,977	0,974
10	0,972	0,976	0,965	0,961
15	0,970	0,977	0,965	0,958
20	0,970	0,975	0,963	0,952
25	0,970	0,973	0,961	0,947
30	0,970	0,973	0,961	0,945
35	0,969	0,971	0,959	0,942
40	0,968	0,970	0,959	0,939
45	0,968	0,968	0,958	0,936
50	0,968	0,967	0,957	0,934
55	0,968	0,967	0,957	0,934
60	0,968	0,967	0,957	0,934

Concentración de DPPH• en el medio (mg/mL)

Tiempo	Concentración de BHA (mg/mL)			
	0,002	0,003	0,007	0,018
0	0,040	0,040	0,040	0,040
5	0,040	0,040	0,040	0,040
10	0,040	0,040	0,040	0,040
15	0,040	0,040	0,040	0,039
20	0,040	0,040	0,040	0,039
25	0,040	0,040	0,040	0,039
30	0,040	0,040	0,040	0,039
35	0,040	0,040	0,039	0,039
40	0,040	0,040	0,039	0,039
45	0,040	0,040	0,039	0,038
50	0,040	0,040	0,039	0,038
55	0,040	0,040	0,039	0,038
60	0,040	0,040	0,039	0,038

% DPPH•rem

Tiempo	Concentración de BHA (mg/mL)			
	0,002	0,003	0,007	0,018
0	100	100	100	100
5	99,134	99,237	99,592	99,337
10	98,930	99,186	98,368	97,959
15	98,777	99,237	98,368	97,653
20	98,726	99,085	98,164	97,091
25	98,726	98,881	97,960	96,581
30	98,726	98,830	97,909	96,326
35	98,624	98,678	97,756	96,020
40	98,573	98,525	97,705	95,713
45	98,522	98,373	97,603	95,458
50	98,522	98,271	97,501	95,254
55	98,522	98,271	97,501	95,254
60	98,522	98,271	97,501	95,254

% Inhibición

Tiempo	Concentración de BHA (mg/mL)			
	0,002	0,003	0,007	0,018
0	0,866	0,762	0,408	0,663
5	1,069	0,813	1,631	2,040
10	1,222	0,762	1,631	2,346
15	1,273	0,915	1,835	2,907
20	1,273	1,118	2,039	3,417
25	1,273	1,169	2,090	3,672
30	1,375	1,321	2,243	3,978
35	1,426	1,474	2,294	4,284
40	1,477	1,626	2,396	4,539
45	1,477	1,728	2,497	4,742
50	1,477	1,728	2,497	4,742
55	1,477	1,728	2,497	4,742

ANEXO F

Diseño experimental para datos de porcentaje de crecimiento de *P. infestans* en cada tratamiento.

Producto	Concentración $\mu\text{g.mL}^{-1}$	PC	Producto	Concentración $\mu\text{g.mL}^{-1}$	PC
AEO	0	100	Ridomil	100	0
Ridomil	200	0	Ridomil	150	0
AEO	150	0	Tween 20	200	83,9
Tween 20	150	86,4	Tween 20	10	87,5
Ridomil	100	0	Ridomil	0	100
Ridomil	150	0	Ridomil	250	0
Ridomil	0	100	AEO	10	58,3
Tween 20	50	86,1	Tween 20	200	87,3
Tween 20	100	79,3	AEO	50	38,9
Ridomil	150	0	AEO	100	42,7
Ridomil	10	0	Ridomil	250	0
Tween 20	250	87,6	AEO	150	0
AEO	250	0	Ridomil	100	0
AEO	200	0	AEO	50	52,5
Ridomil	50	0	Tween 20	100	87,9
Ridomil	50	0	AEO	250	0
Tween 20	200	86,1	AEO	0	100
Tween 20	150	82,2	Tween 20	250	87,3
Tween 20	100	86,4	AEO	100	37,9
AEO	100	50,3	Tween 20	50	87,5
AEO	50	51	Ridomil	150	0
Tween 20	50	87,5	AEO	200	0
AEO	250	0	Ridomil	10	0
Ridomil	0	100	Tween 20	50	81,9
Ridomil	250	0	AEO	50	47,8
Tween 20	250	82,2	Ridomil	50	0
AEO	150	0	Ridomil	250	0
Ridomil	50	0	Tween 20	10	87,5
Tween 20	250	85,6	Tween 20	10	84,5
AEO	200	0	Ridomil	250	0
Ridomil	200	0	Ridomil	10	0
AEO	10	67,1	Tween 20	10	86,3
Tween 20	150	86,1	Ridomil	0	100

Anexo F (continuación)

Producto	Concentración $\mu\text{g.mL}^{-1}$	PC	Producto	Concentración $\mu\text{g.mL}^{-1}$	PC
AEO	0	100	AEO	200	0
Tween 20	50	82,1	Tween 20	200	86,7
Tween 20	0	100	AEO	150	0
Tween 20	0	100	AEO	0	100
AEO	100	54,4	Tween 20	0	100
Tween 20	0	100	Tween 20	200	86,5
AEO	10	61,7	Ridomil	200	0
Tween 20	150	74,2	AEO	50	47,6
AEO	200	0	Tween 20	10	86,6
Tween 20	100	83,1	Ridomil	100	0
AEO	10	40,8	Ridomil	150	0
AEO	150	0	Ridomil	10	0
Tween 20	150	86,9	AEO	10	60,4
AEO	250	0	Ridomil	0	100
Tween 20	250	87,3	AEO	0	100
Ridomil	100	0	Ridomil	200	0
Tween 20	0	100	AEO	250	0
AEO	100	46,8	Ridomil	50	0
Tween 20	100	87,5	Ridomil	200	0
Ridomil	10	0	-	-	-