



TESINA DE GRADO PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA

**USO DE HIERBAS AROMÁTICAS EN EL
DESARROLLO DE UN PATÉ FUNCIONAL**

Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de
Química, UDELAR

Estudiante: Lucía Valentina Maldonado Echeverri

Tutor: Alejandra Medrano

Cotutor: Agustina Irazusta

Junio de 2019
Montevideo, Uruguay

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS:

Al cerrar este capítulo en mi vida, el cual considero uno de los más importantes, ya que con él se me abrirán nuevas oportunidades quiero dedicar y expresar mi más sincero agradecimiento:

A mi mamá Betty por su paciencia y comprensión incondicional. Por darme la fortaleza que tengo y enseñarme a luchar día a día a pesar de las adversidades. Por cada uno de sus sacrificios, desvelos y fuerza de voluntad que tuvo durante todos estos años. Porque siempre luchó y se mantuvo de pie con una sonrisa en el rostro, por dar todo de sí por mi felicidad brindándome constantemente su apoyo y muchísimo cariño. Por darme la mejor herencia en mi vida; “la educación”. Porque este es ahora uno de sus mayores triunfos.

A mi pareja Mauri, por su gran amor y compañía en esta gran batalla que supimos llevar juntos. Por los miles de consejos y la paciencia infinita, por ayudarme con este proyecto, por su gran amor y por la inmensa comprensión.

A mi hermana Lía por su incondicional apoyo, por decirme las palabras correctas para darme fuerza y seguir adelante y sobre todo por su confianza.

A mi abuela Gloria que es la guía, el sostén y ejemplo a seguir de toda la familia, por todo su apoyo incondicional. Por toda la cultura y sabiduría brindada. Por el rol de segunda madre que siempre fue y por toda la fortaleza que siempre nos brinda.

Me gustaría agradecer especialmente a Alejandra Medrano (Tutora) y a Agustina Irazusta (Cotutora) que generosamente, con su paciencia y apoyo, me han orientado para llevar a cabo esta tesis. A todos los miembros del CYTAL, por su buena predisposición. A Jéssica, que me brindó su bondad y entusiasmo, además de consejos y colaboración.

Agradezco además a Ana Hernández que en los inicios de búsqueda de electivas y tesina, supo orientarme de una excelente manera.

A mis amigos y compañeros que supieron apoyarme durante todos estos años, por comprender las inasistencias y festejar hoy este gran logro.

RESUMEN

Se ha puesto de manifiesto una tendencia hacia el consumo de alimentos que aportan beneficios a las funciones fisiológicas del ser humano. Como consecuencia, los consumidores se muestran más preocupados por su salud y por comprar alimentos con un elevado valor nutricional; mientras que las organizaciones mundiales, encargadas de velar por la salud pública, están reconociendo los beneficios de los llamados “alimentos funcionales”, dado que existe suficiente base científica que corrobora los beneficios para la salud que aportan estos productos^{1 2 3 4}.

La demanda de hierbas aromáticas como fuentes de antioxidantes naturales ha aumentado en los últimos años. Además, el uso de éstas es altamente recomendado por los profesionales de la salud hoy en día para reducir el consumo de sal en nuestras dietas, o al presentar beneficios para la salud principalmente debido a sus propiedades antioxidantes⁵. Aunque los resultados todavía son preliminares, se demostró que añadir orégano a los alimentos, estimula los mismos receptores que la sal y esto puede hacer que aquellos que sean grandes consumidores de sal, escojan opciones bajas en sodio⁶.

Por lo tanto, los antioxidantes naturales procedentes de fuentes vegetales como lo es el orégano, se convierten en una opción inteligente para la prevención de trastornos relacionados con el estrés oxidativo como ser enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) y neurodegenerativas^{2 7}. Numerosos estudios epidemiológicos demuestran la existencia de una relación inversa entre el consumo de alimentos que contienen sustancias antioxidantes y el riesgo de que se produzcan tales enfermedades en el ser humano^{3 4}. Por lo tanto, dado la variedad de beneficios potenciales, no es sorprendente que se busquen compuestos de origen natural para reemplazar los antioxidantes sintéticos en el suministro de alimentos⁸.

A pesar de evidencias científicas que demuestran que los alimentos funcionales satisfacen los requerimientos nutricionales y adicionalmente aportan beneficios a la salud^{9 10}, aún es necesario ahondar en los estudios en cuanto a la capacidad antioxidante de éstos. Su acción en el organismo humano se continúa investigando ya que los radicales libres no solamente afectan a las proteínas, lípidos y ADN, sino que afectan las vías de señalización celular¹¹.

Esta razón conllevó a diseñar el presente estudio, teniendo en cuenta los beneficios para la salud expuestos que pueden derivarse del consumo de ciertas hierbas. El principal objetivo de este trabajo fue extraer compuestos antioxidantes provenientes de la planta de orégano (*Origanum vulgare*) utilizando diferentes técnicas, tales como agitación mecánica y el uso de ultrasonido como herramientas extractivas, a distintos tiempos y condiciones, comparando el potencial de cada una de ellas. Según las diversas condiciones de extracción, se obtuvieron siete extractos y a cada uno de éstos se les determinó la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos a través de los métodos ABTS¹² y Folin-Ciocalteu¹³ respectivamente. Como resultado de estas determinaciones se concluyó que las condiciones de extracción con tiempos más prolongados favorecían mayor actividad no siendo significativo ($p \leq 0.05$) el uso del ultrasonido.

Se identificaron los principales compuestos bioactivos presentes en el extracto de orégano con mayor actividad antioxidante mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Siendo este utilizado como ingrediente en el procesamiento de un paté a base de *Pleurotus ostreatus*, especie de hongo comestible de amplio consumo en la actualidad, con el fin de desarrollar un alimento funcional.

El pate funcional desarrollado fue analizado con el fin de verificar su bioactividad, actividad antioxidante y cuantificación de compuestos fenólicos, y su estabilidad fisicoquímica color, y pH, durante 60 días.

Se encontró que no existieron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en los parámetros estudiados, concluyéndose que el extracto de orégano le proporcionó estabilidad en el tiempo y además incrementó la actividad antioxidante y cantidad de compuestos fenólicos presentes en el mismo.

Palabras claves: alimento funcional, antioxidantes, compuestos fenólicos, ultrasonido, *Origanum vulgare*, *Pleurotus ostreatus*.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ENFERMEDADES NO TRANSMISIBLES Y ESTRÉS OXIDATIVO	1
1.2. ALIMENTO FUNCIONAL CON PROPIEDADES ANTIOXIDANTES	1
1.3. ANTIOXIDANTES	1
1.3.1. MOLÉCULAS SOBRE LAS QUE ACTÚAN	2
1.3.2. CLASIFICACIÓN DE ANTOXIDANTES	6
1.3.2.1. ANTIOXIDANTES NATURALES O SINTÉTICOS	6
1.3.2.2. ANTIOXIDANTES ENDÓGENOS O EXÓGENOS.....	7
Figura 4: Clasificación de antioxidantes endógenos y exógenos ⁴⁰	7
1.3.2.2.1. ANTIOXIDANTES EXÓGENOS	8
1.3.2.2.2. ANTIOXIDANTES ENDÓGENOS	11
1.3.2.3. CLASIFICACIÓN SEGÚN EL CAMPO DE ACCIÓN	13
1.3.3. ACCIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES.....	13
1.3.3.1. INTERACCIÓN DIRECTA CON ESPECIES REACTIVAS	13
1.3.3.2. PREVENCIÓN DE LA FORMACIÓN ENZIMÁTICA DE ESPECIES REACTIVAS.....	14
1.3.3.3. PREVENCIÓN DE LA FORMACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEPENDIENTE DE METALES	14
1.3.3.4. ACTIVACIÓN O INDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES	15
1.3.4. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	15
1.3.4.1. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS.....	16
1.4. EL ORÉGANO Y SUS PROPIEDADES	17
1.4.1. GENERALIDADES DEL ORÉGANO.....	17
1.4.2. TAXONOMÍA ⁶³	18
1.4.3. PRODUCCIÓN Y CULTIVO DE ORÉGANO	18
1.4.4. USOS DEL ORÉGANO	18
1.4.5. ANTIOXIDANTES PRESENTES EN EL ORÉGANO	19
1.4.5.1. EXTRACCIÓN DE ANTIOXIDANTES	20
1.4.5.1.1. EXTRACCIÓN CONVENCIONAL	21
1.4.5.1.2. EXTRACCIÓN NO CONVENCIONAL.....	21
1.5. HONGOS COMESTIBLES	22
1.5.1. PLEUROTUS OSTREATUS.....	23
1.5.2. PATÉ DE HONGOS	24
1.5.2.1. ESTRATEGIAS PARA AUMENTAR LA VIDA ÚTIL DEL PATÉ.....	25
2. OBJETIVOS	27
2.1. OBJETIVO GENERAL	27
12.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27

3. MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1. EQUIPOS	28
3.2. ORÉGANO	28
3.2.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ORÉGANO	29
3.2.1.1. CONTENIDO DE HUMEDAD.....	29
3.2.1.2. CONTENIDO DE PROTEÍNAS.....	29
3.2.1.3. CONTENIDO DE LÍPIDOS.....	30
3.2.1.4. CONTENIDO DE FIBRA DIETÉTICA TOTAL.....	30
3.2.1.5. CONTENIDO DE MINERALES.....	31
3.2.1.6. CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS	32
3.2.2. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE ORÉGANO.....	32
3.2.2.1. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	33
3.2.2.2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES	35
3.2.2.3. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN EL ORÉGANO.....	37
3.3. DESARROLLO DE UN ALIMENTO FUNCIONAL UTILIZANDO ORÉGANO COMO FUENTE DE COMPUESTOS BIOACTIVOS.....	38
3.3.1. ESCALDADO DEL PATÉ DE HONGOS.....	38
3.3.2. FORMULACIÓN DEL PATÉ.....	38
3.3.3. INCORPORACIÓN DEL ORÉGANO EN EL PATÉ DE HONGOS	39
3.3.4. ALMACENAMIENTO DEL PATÉ DE HONGOS.....	40
3.3.5. ESTUDIO DEL EFECTO DEL HONGO FRENTE A LOS ANTIOXIDANTES PROVENIENTES DEL ORÉGANO	41
3.3.6. CARACTERIZACIÓN Y ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DEL PATÉ DE HONGOS	41
3.3.6.1. DETERMINACIÓN DE COLOR.....	42
3.3.6.2. MEDICIÓN DE pH	42
3.3.6.3. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y COMPUESTOS FENOLICOS TOTALES PRESENTES EN EL PATÉ.....	42
3.3.6.3.1. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENOLICOS PRESENTES EN EL PATÉ DE HONGO.....	42
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	43
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
4.1. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DEL ORÉGANO.....	44
4.2. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE ORÉGANO	45
4.2.1. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	46
4.2.2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES.....	49
4.2.2.1. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN EL ORÉGANO	51
4.2.3. RELACIÓN ENTRE EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES Y LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	53
4.3. DESARROLLO DE UN ALIMENTO FUNCIONAL UTILIZANDO ORÉGANO COMO FUENTE DE COMPUESTOS BIOACTIVOS.....	55

4.3.1. ESCALDADO	55
4.3.2. PATÉ DE HONGOS	56
4.3.3. ESTUDIO DEL EFECTO DEL HONGO FRENTE A LOS ANTIOXIDANTES PROVENIENTES DEL ORÉGANO	56
4.3.4. CARATERIZACIÓN Y ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DEL PATÉ	58
4.3.4.1. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DEL COLOR	58
4.3.4.2. MEDIDAS DE pH	59
4.3.4.3. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	60
4.3.4.4. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES	61
4.3.4.4.1. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN EL PATÉ DE HONGO.....	61
5. CONCLUSIÓN	63
6. REFERENCIAS	64

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ENFERMEDADES NO TRANSMISIBLES Y ESTRÉS OXIDATIVO

Las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) son aquellas que no se transmiten de persona a persona. Los cuatro tipos principales de enfermedades no transmisibles son: las cardiovasculares, el cáncer, las respiratorias crónicas y la diabetes.

Las ECNT originan casi el 80% de las muertes a nivel mundial, significando aproximadamente 40 millones de víctimas por año. En el caso de Uruguay, este tipo de enfermedades son la primera causa de muerte².

1.2. ALIMENTO FUNCIONAL CON PROPIEDADES ANTIOXIDANTES

Se denomina alimento funcional a aquél que es elaborado no solo para proporcionar características nutricionales sino también para cumplir una función específica como ser: mejorar el estado de salud y el bienestar, así como también reducir el riesgo de contraer enfermedades. Para ello se les incorporan componentes biológicamente activos, tales como minerales, vitaminas, ácidos grasos, fibra alimenticia, antioxidantes, entre otros. Esa funcionalidad es lograda mediante diferentes estrategias como ser; maximizar la presencia de un compuesto funcional del propio alimento, la incorporación externa de un componente bioactivo o el incremento de la biodisponibilidad del compuesto de interés. Cabe aclarar que si bien poseen un efecto positivo en la salud, no son considerados medicamentos. Son productos que se consumen como parte de una dieta normal y se propone que ayudan a reducir el riesgo de enfermedades a través de una alimentación sana y equilibrada¹⁴.

1.3. ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes se definen como moléculas que estando presentes en baja concentración respecto a las biomoléculas que protegen, inhiben o retrasan la iniciación o propagación de reacciones en cadena por moléculas con capacidad de actuar como oxidantes, generadas por

la acción de los radicales libres y especies reactivas del oxígeno (ROS)¹⁵. Es decir, un antioxidante es una sustancia que impide la oxidación de otra, entendiéndose por oxidación no solo el ataque del oxígeno a una sustancia, sino también una reacción química por la cual se transfieren electrones desde una sustancia donante de electrones a otra susceptible de aceptarlos. La oxidación es por tanto una pérdida de electrones y tiene que ir acoplada a una reducción o aceptación de los electrones cedidos. Por lo tanto, los compuestos antioxidantes poseen la capacidad de proteger a las células contra el daño oxidativo y es por eso que estos compuestos han atraído gran atención en relación con el papel que tienen en dietas enfocadas a la prevención de diversas enfermedades¹⁰.

La auto oxidación de lípidos que causa una reacción en cadena mediada por radicales libres ha sido una de las principales causas del deterioro de la calidad de los alimentos, especialmente en matrices alimentarias ricas en PUFA (ácidos grasos poliinsaturados) después de las alteraciones producidas por microorganismos, y representa el factor limitante de la vida útil de muchos de ellos¹⁶. Las industrias alimentarias intentan evitar la oxidación de los alimentos utilizando diferentes técnicas, que van desde el envasado hermético al vacío hasta el uso de sustancias con propiedades antioxidantes¹⁷.

1.3.1. MOLÉCULAS SOBRE LAS QUE ACTÚAN

Las especies reactivas del oxígeno (EROS o ROS) son especies químicas que contienen uno o más electrones de valencia desapareados en sus orbitales externos. Se incluyen dentro de éstas: iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos. Una vez formadas, sustraen el electrón que necesitan de moléculas próximas y de esta manera la molécula estable que lo cede se convierte en una especie reactiva por quedar con un electrón desapareado, desencadenando como consecuencia, una reacción en cadena que perjudica la supervivencia celular. La vida media de estos radicales libres es de un tiempo breve, pero tienen la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un gran daño a moléculas, membranas celulares y tejidos¹⁸. Estas moléculas, en concentraciones anormalmente elevadas, son causantes de patologías crónicas de gran prevalencia como son las enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson), cardiovasculares, hipertensión, cáncer, diabetes, arterosclerosis, artritis reumatoide y el envejecimiento prematuro, entre otras^{19 20 21 22 23} (Figura 1).

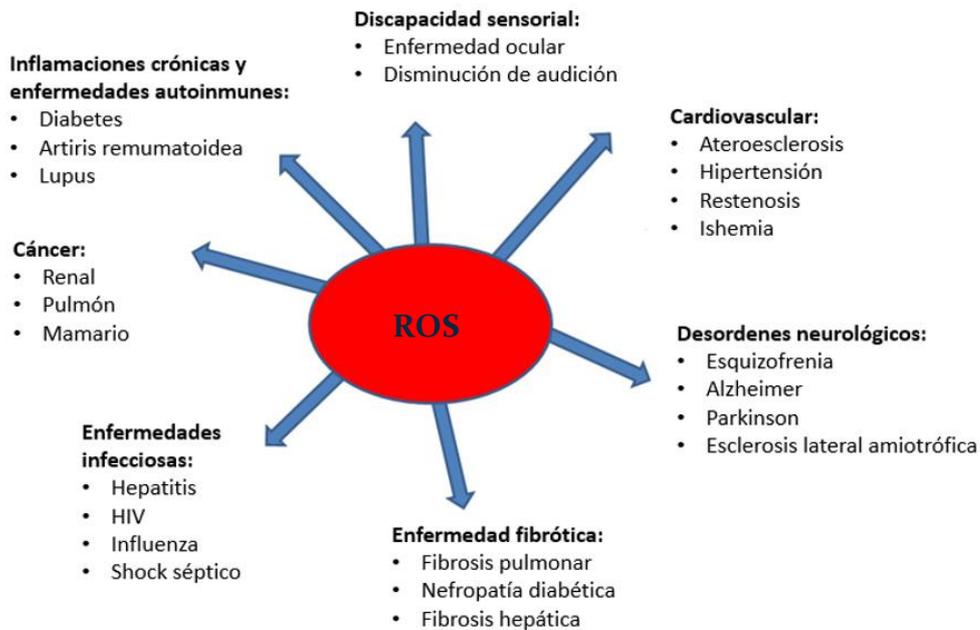


Figura 1: Enfermedades y daños generados por las especies reactivas del oxígeno²⁴.

Los radicales libres y ROS se forman por medio de la reducción parcial de la molécula de oxígeno (Figura 2), formándose así especies reactivas que se pueden clasificar en²⁵:

- Derivados radicales: anión superóxido $O_2^{\bullet-}$, hidróxilo HO^{\bullet} , alcóxilo RO^{\bullet} , peróxilo ROO^{\bullet} , hidroperóxilo HOO^{\bullet} .
- Derivados no radicales: peróxido de hidrógeno H_2O_2 , ácido hipocloroso $HOCl$, ácido hipobromoso $HOBr$, ozono O_3 , oxígeno singlete O_2 .

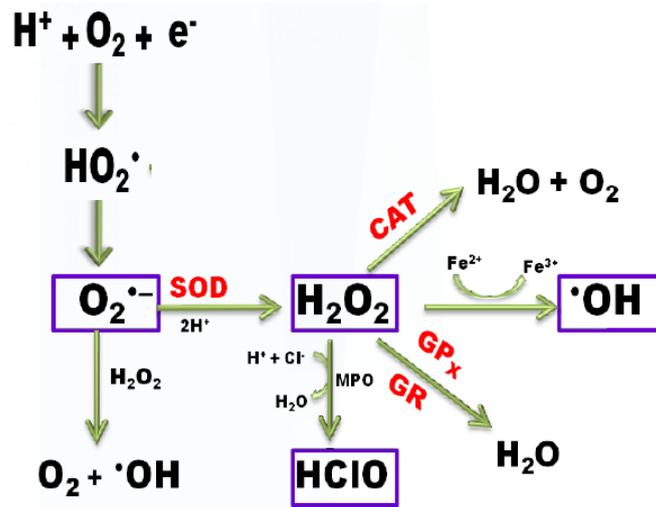


Figura 2: Algunas de las especies reactivas del oxígeno. En violeta se señala el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidróxilo, y el ácido hipocloroso. En rojo se mencionan las enzimas que participan del proceso: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutación peroxidasa (GPx), glutación reductasa (GR)²⁶.

Se puede distinguir cuatro fuentes endógenas que originan la mayoría de agentes oxidantes producidos por las células:

- En el transcurso normal de la respiración aeróbica, las mitocondrias consumen O_2 reduciéndolo en varias etapas a H_2O (Figura 3). Inevitablemente, a lo largo de este proceso aparecen subproductos como: $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y $\cdot\text{OH}$ ²⁷.
- Las células fagocíticas (leucocitos neutrófilos, macrófagos y eosinófilos), al activarse por medio de mediadores proinflamatorios o de productos bacterianos, víricos o de parásitos, destruyen las células infectadas por medio de un ataque oxidativo (literalmente una “explosión” oxidativa) en el que se producen grandes cantidades de $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$, $\text{NO}\cdot$ y OCl^- ²⁸. Las infecciones crónicas llevan a una actividad fagocítica continua que provoca una inflamación crónica que es el principal factor de riesgo del cáncer²⁷.
- Los peroxisomas, orgánulos encargados de la degradación de ácidos grasos y otras moléculas, producen H_2O_2 como subproducto, que es degradado de forma natural por la enzima catalasa. Bajo ciertas condiciones, alguno de los peróxidos escapan a la degradación

y se liberan a otros compartimentos celulares provocando un incremento del daño por oxidación en el ADN²⁹.

d. Las enzimas del complejo Citocromo P450 son las principales responsables del metabolismo oxidativo de los xenobióticos. La inducción de estas enzimas previene los efectos de toxicidad aguda de agentes extraños al organismo, pero también produce subproductos oxidantes que pueden dañar el ADN³⁰.

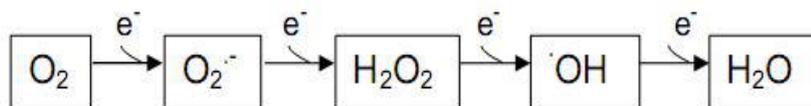


Figura 3: Reducción del oxígeno hasta obtener agua como producto final³¹.

Por otra parte, debe tenerse en cuenta que el organismo también utiliza estos compuestos oxidantes en procesos normales, pudiendo actuar a distintos niveles³²:

- i) Como señales intercelulares y reguladoras de genes implicados en el desarrollo celular.
- ii) Como inductores de la expresión de genes.
- iii) En la regulación de la estructura y función de determinadas proteínas.
- iv) Interviene en el control del tono muscular.
- v) Interviene en la síntesis de tiroxina en la glándula tiroides.
- vi) Participa en los procesos de eliminación de patógenos, entre otros aspectos importantes.

La continua generación de especies reactivas del oxígeno y de otros radicales libres durante el metabolismo celular aeróbico, es un proceso normal y necesario para el suministro de energía y buen funcionamiento celular, estimulando la proliferación celular y/o actuando como mediadores para la activación de la célula³³. Por lo tanto, el cuerpo humano produce de manera natural los radicales libres. Los mismos, generalmente se encuentran compensados por los sistemas de defensa antioxidantes endógenos, los cuales ayudan a mantener el equilibrio redox, de lo contrario, este fenómeno sería una amenaza grave para la salud³⁴.

El desequilibrio entre especies oxidantes y antioxidantes, debido por un lado a la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno o por otra parte al déficit de antioxidantes,

se conoce como “*estrés oxidativo*”. Ciertas condiciones ambientales, la exposición a ciertos compuestos químicos, el ejercicio físico intenso, radiaciones ionizantes y no ionizantes, drogas, pesticidas, metales pesados, xenobióticos, bacterias, virus, estrés, entre otros; pueden derivar en un exceso de radicales libres que conduzca a una situación de estrés oxidativo. Además, llevar una dieta pobre en antioxidantes como ser el escaso consumo de frutas y verduras, de frutos secos y de bebidas tan recomendables como el té, o un abuso de carnes rojas y productos panificados industriales, provoca la escasez de antioxidantes. En este punto, la dieta juega un papel importante en la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, fundamentalmente a través del aporte de compuestos bioactivos, como ser antioxidantes de origen vegetal³⁵.

El efecto nocivo que puede provocar el estrés oxidativo en los sistemas biológicos, deriva de la capacidad que tienen los radicales libres de atacar y reaccionar con componentes moleculares de estructuras celulares; como son los ácidos nucleicos, los lípidos de membrana, las proteínas estructurales y enzimáticas, los carbohidratos, entre otros³⁶.

1.3.2. CLASIFICACIÓN DE ANTOXIDANTES

1.3.2.1. ANTOXIDANTES NATURALES O SINTÉTICOS

Existen varios tipos de antioxidantes que se han utilizado históricamente en la industria alimentaria, así como también en otras como la cosmética, farmacéutica o nutrición animal. Por una parte están los antioxidantes naturales, los cuales son obtenidos íntegramente de fuentes naturales, y por otra los antioxidantes sintéticos, creados a partir de procesos químicos. Entre los antioxidantes naturales empleados se encuentran los derivados de frutas, hierbas (tales como el orégano) y vegetales, que han sido caracterizados como pertenecientes a este grupo³⁷.

Debido a la tendencia que está adoptando la sociedad en referencia a la búsqueda de hábitos más saludables y a una mayor exigencia de la legislación en materias de seguridad alimentaria, los antioxidantes naturales están experimentando un crecimiento sostenido a lo largo de los últimos años, en detrimento de los antioxidantes sintéticos. Este último grupo conformado principalmente por el hidroxianisolbutilado (BHA), el hidroxitoluenobutilado (BHT), el terbutil hidroquinona (TBHQ) y gelato de propilo (PG), está siendo restringido

debido a los posibles riesgos para la salud humana ya que pueden actuar como agentes promotores del cáncer y/o teratógenos, producir un aumento significativo del hígado, una marcada proliferación del retículo endoplásmico, además de no aportar beneficios nutricionales adicionales³⁸. Es por esto, que el uso de estos antioxidantes sintéticos está limitado a ciertas cantidades, y además presenta inconvenientes dado que son bastante volátiles y se descomponen con facilidad a temperaturas elevadas^{38 39 40}.

Según la normativa vigente en el Uruguay, decreto N° 315/994 (Reglamento Bromatológico Nacional⁴¹), las cantidades máximas permitidas de los antioxidantes sintéticos más frecuentes: BHA (hidroxianisolbutilado), BHT (hidroxitoluenobutilado), TBHQ (terbutil hidroquinona) y PG (galato de propilo) es de entre 40 mg/Kg para alimentos varios.

1.3.2.2. ANTIOXIDANTES ENDÓGENOS O EXÓGENOS

Las sustancias antioxidantes además, se pueden clasificar en dos principales sistemas; endógenos y exógenos, los cuales pueden actuar tanto en el espacio intracelular como en el extracelular (Figura 4).

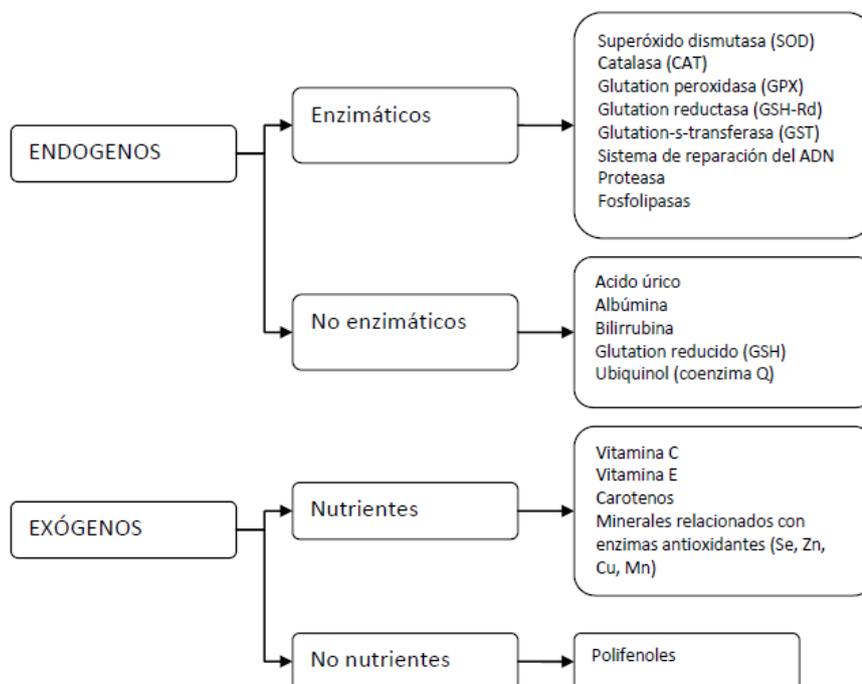


Figura 4: Clasificación de antioxidantes: endógenos y exógenos⁴².

1.3.2.2.1. ANTIOXIDANTES EXÓGENOS

Este grupo de antioxidantes está integrado principalmente por sustancias nutritivas como son las vitaminas E y C, minerales asociados con enzimas antioxidantes, y carotenoides; los cuales son incorporados con la alimentación. Además pertenecen a este grupo, antioxidantes no nutrientes denominados polifenoles.

- La vitamina E está constituida por varios tipos de compuestos naturales, de los cuales el α -tocoferol tiene la mayor actividad biológica (antioxidante y estabilizador de las membranas en los tejidos humanos). Su acción antioxidante reside en la capacidad de neutralizar los radicales $O_2^{\bullet-}$, HO^{\bullet} y LOO^{\bullet} a formas menos nocivas interrumpiendo la lipoperoxidación en la fase de propagación.
- La vitamina C (esencial) es un antioxidante hidrosoluble con un alto poder reductor, participa en el metabolismo intermediario y oxidativo, en la reabsorción de hierro, es necesaria para la respuesta inmune, actúa como cofactor para numerosas enzimas implicadas en la biosíntesis de colágeno, carnitina y algunos neurotransmisores. Su capacidad se debe a secuestrar especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno protegiendo a las LDL de su ataque⁴³.
- Los carotenoides son pigmentos sintetizados en plantas y otros organismos fotosintéticos, donde actúan como “quencheadores” (desactivadores) del oxígeno singlete.
- Los compuestos fenólicos o polifenoles son considerados como los principales antioxidantes exógenos provenientes de los alimentos⁴⁴. Son omnipresentes en los órganos de las plantas y constituyen, por lo tanto, una parte integral de la dieta humana ya que el cuerpo humano no puede producir estas sustancias.

Desde un punto de vista estructural, todos los polifenoles exhiben en su estructura uno o más grupos hidroxilos (HO-) unidos a un anillo aromático (benceno), es decir, presentan algún grupo fenólico (Figura 5)³.

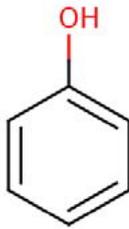


Figura 5: Estructura de un compuesto fenólico, formado por uno o más grupos hidroxilos (HO-) unidos a un anillo aromático (benceno).

Estos compuestos participan de diversas funciones, tales como la asimilación de nutrientes, la síntesis proteica, la actividad enzimática, la fotosíntesis, la formación de componentes estructurales, la alelopatía y la defensa ante los factores adversos del ambiente⁴⁵. La característica antioxidante de los fenoles se debe a la reactividad del grupo fenol⁴⁶ y su capacidad para capturar radicales libres⁴⁷.

Se han encontrado hasta el momento alrededor de 8000 polifenoles distintos, ampliamente dispersos en todo el reino vegetal, que suelen clasificarse en diferentes grupos según el número de anillos fenólicos que contienen y el sustituyente unido a éstos (Figura 6).

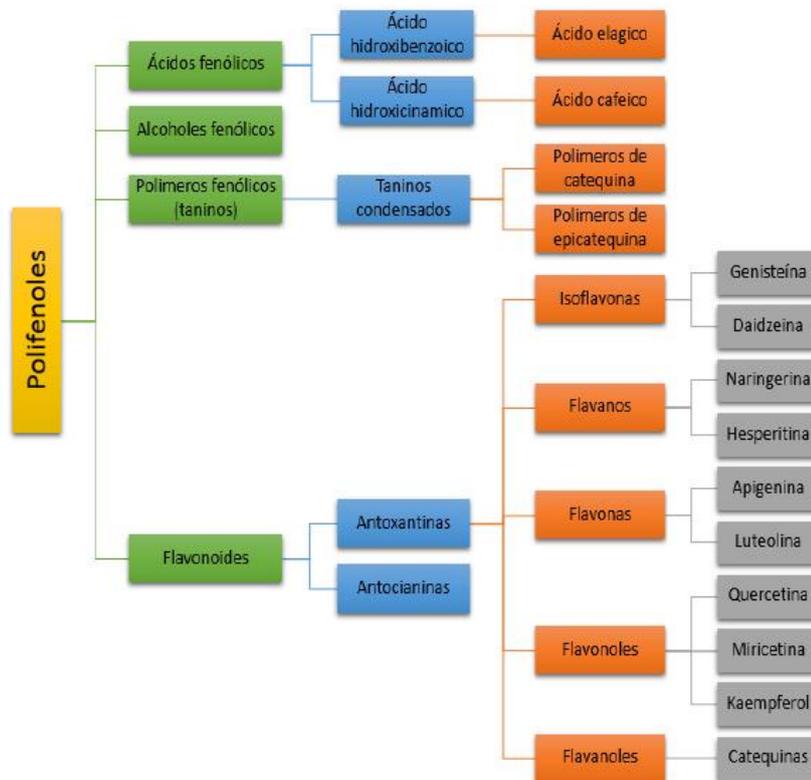


Figura 6: Representación esquemática de los polifenoles⁴⁷.

La actividad antioxidante de los distintos grupos de compuestos depende de la estructura individual y del número de oxidrilos sustituyentes, así como del peso molecular. Son moléculas que incluyen los ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos, polímeros fenólicos y flavonoides.

Para que un polifenol actúe como un antioxidante debe satisfacer dos condiciones básicas:

- i) Estar presente en baja concentración en relación al sustrato a ser oxidado, ya que así puede retrasar o prevenir la auto-oxidación o la oxidación mediada por radicales libres.
- ii) El radical resultante formado después de la captura debe ser estable para interrumpir la reacción en cadena de la oxidación.

Dentro de los polifenoles se encuentra un grupo de moléculas de bajo peso molecular, esenciales para el ser humano denominados flavonoides, nombre que deriva del latín *flavus*, cuyo significado es “amarillo”, los cuales constituyen la subclase de polifenoles más abundantes dentro del reino vegetal. Se han descrito más de 5000 compuestos⁴⁸.

Los flavonoides (Figura 7), son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenólicos, ligados a través de un anillo de pirano (heterocíclico).

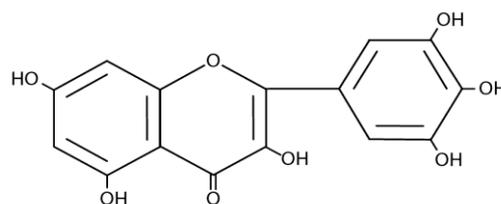


Figura 7: Estructura química de un flavonoide⁴⁵.

En función de los grados de oxidación e insaturación del anillo heterocíclico se pueden diferenciar varias clases de flavonoides, y dentro de cada clase se pueden establecer diferencias en base a la naturaleza y número de los sustituyentes con grupos hidroxilo fenólicos⁴⁹. Poseen excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición.

La estructura básica y más abundante de estos compuestos es la quercetina. Algunos autores clasifican a los flavonoides como las moléculas de mayor importancia bioactiva como nutraceuticos presentes en las plantas⁴⁸.

Sus propiedades anti radicales libres se dirigen fundamentalmente hacia el radical hidroxilo y superóxido. También se ha descrito su capacidad de modificar la síntesis de eicosanoides con respuestas antiprostanoide y antiinflamatoria. Por otra parte poseen efectos antitrombóticos, previniendo la agregación plaquetaria, además de proteger a las lipoproteínas de baja densidad de los procesos de oxidación⁴².

Dentro de los polifenoles, además, existen los compuestos no flavonoides, siendo estos: ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos y polímeros fenólicos. Están formados por un anillo aromático con al menos un grupo hidroxilo con grupos aldehído, alcohol o ácido, solos o esterificados con ácidos orgánicos o unidos a azúcares⁵⁰. Existe una gran variedad de fenoles ácidos distribuidos en productos de origen vegetal como la cúrcuma, el ácido caféico, ferúlico y clorogénico. Los polímeros fenólicos son compuestos de alto peso molecular como los taninos condensados.

1.3.2.2.2. ANTIOXIDANTES ENDÓGENOS

El cuerpo posee mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo inducido por radicales libres que implican: mecanismos preventivos, mecanismos de reparación, defensas físicas y defensas antioxidantes.

El sistema de antioxidantes endógenos está basado en enzimas que se encuentran en nuestro organismo, además de compuestos no enzimáticos como ser: ácido úrico, albúmina, bilirrubina, ubiquinol y vitaminas.

Entre las enzimas se encuentran (Figura 8):

- Superóxido dismutasa (SOD): cataliza la disminución del radical superóxido para formar peróxido de hidrógeno.

- Catalasa (CAT): posee doble actividad (catalasa y peroxidasa), la cual cataliza la reacción de reducción del peróxido de hidrógeno a agua.
- Glutación peroxidasa (GPx): se encarga de la reducción de hidroperóxidos intracelulares, peróxido de hidrógeno, grandes moléculas de peróxidos lipídicos procedentes del ataque de los radicales libres de oxígeno sobre los lípidos poliinsaturados de las membranas y sobre productos derivados de las reacciones catalizadas por la enzima lipooxigenasa. En todas las reducciones, emplea dos moléculas de glutatión reducido (GSH), siendo el mismo su sustrato esencial, el cual es capaz de conjugarse con compuestos potencialmente tóxicos al solubilizar y facilitar su excreción biliar.
- Glutación reductasa (GR): conocida también como glutatión-disulfuro reductasa (GSR). Su acción antioxidante es doble, ya que ésta cataliza no solo la reducción del glutatión disulfuro (GSSG) sino que además, como resultado de ello, da lugar a la formación de glutatión en su forma sulfhidrilo (GSH).
- Oligoelementos: el cobre, manganeso, zinc, hierro y selenio, son cofactores necesarios para el buen funcionamiento de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa⁵¹.

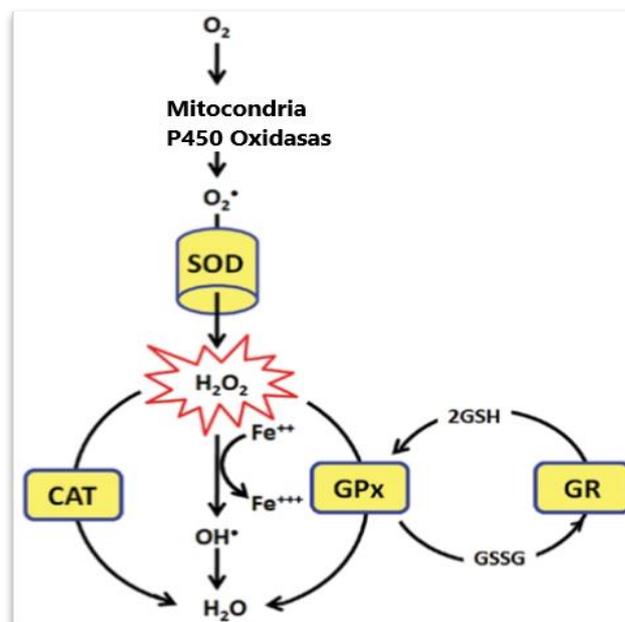


Figura 8: Enzimas antioxidantes endógenas: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR)³².

1.3.2.3. CLASIFICACIÓN SEGÚN EL CAMPO DE ACCIÓN

Se denominan antioxidantes primarios a los que impiden la formación de radicales libres y quelan metales de transición. Son llamados antioxidantes secundarios los que interrumpen la reacción de propagación por inactivación o desplazan a las especies reactivas de oxígeno. Los antioxidantes terciarios son los que reparan el daño causado por moléculas o eliminan aquellas que se han estropeado²⁵.

1.3.3. ACCIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES

1.3.3.1. INTERACCIÓN DIRECTA CON ESPECIES REACTIVAS

El mecanismo más conocido, aunque no necesariamente el más relevante a la acción, se refiere a la capacidad que tienen muchos antioxidantes para actuar como “estabilizadores o desactivadores de diversas especies reactivas”. Esto último supone la conocida actividad “scavenger” (de barrido) de radicales libres, que poseen muchas moléculas antioxidantes. En el caso de los radicales libres, tal acción implica su estabilización a través de la cesión de un electrón a dichas especies reactivas. Este mecanismo, definido como “SET” o “ET” (single electrón transfer), permite que el radical libre pierda su condición por “pareamiento” de su electrón desapareado. Una consecuencia para el antioxidante es que, como resultado de ceder un electrón, éste se convierte en un radical libre y termina oxidándose bajo una forma que es de baja o nula reactividad hacia su entorno. Junto a este mecanismo, muchos antioxidantes pueden estabilizar radicales libres a través de un mecanismo que implica la transferencia directa de un átomo de hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático a un radical libre dada la posibilidad de descolocación de cargas en el sistema de dobles enlaces del anillo aromático^{52 53}. Tal mecanismo es definido como “HAT” (hydrogen atom transfer). En este último caso, el radical libre también queda estabilizado electrónicamente dada su facilidad para ceder un radical hidrógeno⁵⁴. Por lo tanto, el antioxidante y el radical peroxilo forman una asociación estable mediante la transferencia de un átomo de hidrógeno desde el antioxidante al radical, de forma que se detiene la reacción de oxidación en cadena. La mayoría de los ensayos basados en HAT aplican un esquema de reacción competitivo, en el que el antioxidante y el sustrato compiten por los radicales peroxilo⁵⁵.

Los antioxidantes cuya acción es promovida a través de mecanismos SET y/o HAT son mayoritariamente los antioxidantes no-enzimáticos, sean éstos normalmente bio-sintetizados por el organismo humano, o bien ingresan al organismo a través de la dieta. La mayor parte de los antioxidantes que actúan a través de estos mecanismos presentan en su estructura química, como grupos funcionales, hidroxilo fenólicos (ejemplo, todos los polifenoles y los tocoferoles). No obstante, otros antioxidantes no fenólicos, como el glutatión, la melatonina, y los ácidos ascórbico, dihidro-lipóico y úrico, son también ejemplos de moléculas cuya acción es promovida por mecanismos SET y/o HAT.

1.3.3.2. PREVENCIÓN DE LA FORMACIÓN ENZIMÁTICA DE ESPECIES REACTIVAS

Algunos antioxidantes pueden actuar previniendo la formación de ROS, inhibiendo ya sea la expresión, la síntesis o la actividad de enzimas pro-oxidantes involucradas en la generación de especies reactivas, como la NADPH-oxidasa (NOX), la xantina-oxidasa (XO), la mieloperoxidasa (MPO) y la óxido nítrico sintasa (NOS). Este tipo de acción antioxidante no demanda que un antioxidante exhiba en su estructura características que típicamente se asocian a los mecanismos de acción SET o HAT. Ejemplos de inhibidores de la actividad de estas enzimas son compuestos provenientes de la dieta, ciertos polifenoles y algunos agentes empleados en la terapia de la gota, como alopurinol y febuxostat, que inhiben la xantina oxidasa⁵⁴.

1.3.3.3. PREVENCIÓN DE LA FORMACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEPENDIENTE DE METALES

Un mecanismo que también implica la inhibición de la formación de especies reactivas se relaciona con contraponer la capacidad que tienen ciertos metales de transición, como hierro y cobre (ambos en su estado reducido), para catalizar la formación de radicales superóxido mediante la reducción de oxígeno y de radicales hidroxilo, a partir de peróxido de hidrógeno (Reacción de Fenton). Aquellas moléculas que tienen la habilidad de unir tales metales formando complejos o quelatos, logran inhibir la actividad redox de éstos, previniendo la formación de las especies reactivas anteriormente mencionadas.

Se incluyen en este grupo de antioxidantes: i) ciertos péptidos y proteínas normalmente biosintetizadas por el organismo y cuya función fisiológica les implica transportar, almacenar y/o excretar hierro (como ferritina) o cobre (como metalotioneína y ceruloplasmina), ii) ciertos polifenoles que acceden al organismo a través de la dieta y cuya característica distintiva es presentar en su estructura flavonoidea un grupo catecol en el anillo B, y iii) algunos agentes que son empleados en la terapia de remoción de metales como desferroxamina que capturan hierro, y penicilamina o tetratiomolibdato que capturan cobre⁵⁶.

1.3.3.4. ACTIVACIÓN O INDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Como parte de la defensa antioxidante, el organismo humano bio-sintetiza ciertas enzimas cuya función es remover especies reactivas, principalmente ROS. Entre éstas destacan las siguientes: superóxido dismutasa (SOD, en sus isoformas Cu/Zn y Mn-dependientes), catalasa (CAT, hierro-dependiente), glutatión peroxidasa (GSpx; Se-dependiente), glutatión-S-transferasa (GST) en su tipo peroxidasa, glutatión reductasa (GSSG), y sulfoxi-metionina-reductasa. La acción antioxidante de todas estas enzimas se traduce en una disminución del estado redox celular. Existe evidencia de que ciertos compuestos presentes en la dieta humana podrían inducir la expresión de genes que codifican para la síntesis de algunas de las enzimas antioxidantes⁵⁴.

1.3.4. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Para predecir el potencial antioxidante de los alimentos, es importante determinar la capacidad antioxidante tanto sobre el organismo humano, como frente a las reacciones de alteración que disminuyen la calidad y el valor nutricional del propio alimento. Lo ideal sería que todas esas propiedades pudieran medirse en cada componente para valorar la capacidad antioxidante total, lo cual ha resultado ser muy complejo. En la práctica, se han desarrollado diversos ensayos para conjugar las propiedades en una sola estimación de la capacidad antioxidante^{57 58}.

Existen métodos directos que abarcan el empleo de un sustrato oxidable. Así, estos métodos evalúan el efecto inhibitorio de una sustancia potencialmente antioxidante sobre la

degradación oxidativa del sustrato utilizado. Este tipo de aproximación se combina con una estrategia de medición basada en la detección de los productos de oxidación. De éstos, el método del ácido tiobarbitúrico (TBA) es de los más utilizados⁵⁸.

Sin embargo, los métodos indirectos son los fundamentalmente utilizados para determinar la capacidad antioxidante. Se basan en la estabilización de un radical libre artificial (por transferencia de hidrógeno o electrones) o la reducción de un metal de transición pro-oxidante (por transferencia de electrones)⁵⁹.

Los ensayos HAT incluyen la inhibición de la auto oxidación inducida de lipoproteínas de baja densidad, la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), el parámetro antioxidante de atrapamiento de radicales totales (TRAP) y los ensayos de blanqueo de crocina¹.

Por otro lado, los métodos ET más habituales son: la inhibición del radical 1,10-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH), el método de capacidad antioxidante de equivalencia de Trolox (TEAC), el ensayo de decoloración del catión radical ABTS (ABTS), el ensayo de poder antioxidante reductor férrico (FRAP), el método de capacidad antioxidante reductora de ión cúprico (CUPRAC). Los ensayos basados en ET miden la capacidad de un antioxidante en la reducción de un oxidante, que cambia de color al reducirse. El grado de cambio de color se correlaciona con la concentración de antioxidantes de la muestra. DPPH y ABTS también pueden actuar como HAT.

1.3.4.1. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS

Hay un gran número de estudios sobre la determinación de polifenoles totales. El método más utilizado es el ensayo de fenoles totales por reactivo de Folin-Ciocalteu (FCR)¹³. No es exactamente un método de medida de capacidad antioxidante, sino de contenido en polifenoles. Dado el importante papel de los polifenoles en la capacidad antioxidante de los alimentos vegetales, se ha simplificado su expresión como un método de determinación de capacidad antioxidante ya que proporciona la idea de que la muestra puede presentar actividad antioxidante¹³.

1.4. EL ORÉGANO Y SUS PROPIEDADES

1.4.1. GENERALIDADES DEL ORÉGANO

El nombre de orégano (*Origanum vulgare*) proviene del griego *oros* y *ganos*, que significa adorno o alegría de la montaña, hace referencia al aspecto (Figura 9) y aroma agradable de esta planta que se empleaba desde la antigüedad como aperitivo amargo, tónico y desinfectante de heridas⁶⁰.



Figura 9: Aspecto de la planta de orégano *Origanum vulgare*³¹.

Los romanos la consideraban una planta portadora de paz y felicidad y la utilizaban para ornamentar sus casas. En Inglaterra fue introducida por los romanos durante la conquista, dado que lo emplearon para el tratamiento de la tos convulsa.

La planta de orégano es perenne y crece de forma espontánea. Tiene raíces rastreras, tallos leñosos ramificados y hojas de color verde oscuro, opuestas y pecioladas⁶¹. Tiene una altura que varía entre 35 y 45 cm⁶². Las flores se disponen en grupos en la base de las hojas más altas o en espigas terminales y cada flor produce, cuando está madura, cuatro estructuras pequeñas similares a semillas.

Los tipos más comunes de orégano utilizados actualmente como especia e incorporados en alimentos son: *Origanum vulgare*, nativo de Europa, y *Lippia graveolens*, planta nativa de México de uso culinario común. El género *Origanum* pertenece a la familia Lamiaceae,

mientras que el *Lippia graveolens*, a la familia Verbenaceae. Al menos 60 especies y 17 géneros que pertenecen a diversas familias botánicas se conocen como orégano⁶³.

1.4.2. TAXONOMÍA⁶⁴

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Lamiales*

Familia: *Lamiaceae*

Subfamilia: *Nepetoideae*

Género: *Origanum*

Especie: *vulgare*

1.4.3. PRODUCCIÓN Y CULTIVO DE ORÉGANO

Los principales países productores en América Latina son: México, Brasil, Chile, Costa Rica, Argentina y Perú⁶⁵.

La planta de orégano es resistente al frío, pero temperaturas menores de 5 °C afectan al cultivo retrasando su crecimiento y quemando los bordes de las hojas. Este cultivo se adecua a cualquier tipo de suelo que no sea salino, los mejores rendimientos se obtienen en suelos francos. Crece en áreas con alta elevación⁶⁶. La vida útil del orégano es de aproximadamente 5 o 6 años y generalmente se realiza una cosecha en el primer año y dos en los años siguientes⁶⁷.

1.4.4. USOS DEL ORÉGANO

En los últimos años se ha incrementado la demanda mundial de especies y hierbas aromáticas orgánicas, en la industria alimentaria como un medio para conservar y mejorar el sabor de los alimentos, así como para otras industrias de índole medicinal y cosméticas. Una de las plantas aromáticas con mayor demanda en el mercado internacional es el orégano, pues, su buena calidad le ha permitido capturar el interés de los consumidores en todo el mundo⁶⁸.

Se ha informado que el orégano y su aceite esencial podrían usarse como herbicidas naturales⁶⁹. En la industria, se obtiene el aceite esencial para resaltar y fijar aromas, se usa en perfumería, cosméticos, en la elaboración de jabones perfumados y productos de tocador. En medicina, se utiliza para calmar el dolor de oído, debido a la acción ligeramente anestésica, además para calmar cólicos intestinales y en baños calientes para los dolores musculares y reumáticos, ataques asmáticos como expectorante, dolor de dientes, antiespasmódico, diaforético, dolores menstruales y como tópico nervioso⁷⁰. Además, posee una buena capacidad antimicrobiana contra microorganismos patógenos como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, entre otros. Estas características son muy importantes para la industria alimentaria ya que pueden favorecer la inocuidad y estabilidad de los alimentos como también protegerlos contra alteraciones lipídicas⁷¹. También se sabe que el orégano, es uno de los alimentos que presenta grandes cantidades de compuestos antioxidantes^{72 73}.

1.4.5. ANTIOXIDANTES PRESENTES EN EL ORÉGANO

Los antioxidantes más comunes que posee el orégano son polifenoles⁷⁴. Informes de diferentes especies de orégano han demostrado que las flavonas se encuentran entre los subgrupos más abundantes de flavonoides seguidos por flavonoles y flavanonas. Los principales compuestos pertenecientes a estas categorías son, catequina, apigenina, hispidulina, luteolina, quercetina, rutina y sus derivados^{75 76 77 78 79 80}.

Entre los ácidos fenólicos más comunes, se encuentran^{18 81 80 82 83 84}:

- Derivados del ácido hidroxicinámico: ácido caféico, ácido rosmarínico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, y ácido p-cumárico.
- Derivados de ácido hidroxibenzoico: el ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido vanílico, ácido siríngico.

Para muchos investigadores, el ácido rosmarínico^{76 85 86 75 18} es el antioxidante dominante entre los ácidos fenólicos en la hierba de orégano, no solo en extractos acuosos, sino también en extractos alcohólicos y oleaginosos⁸⁰.

Además, los resultados de varios estudios indicaron que los efectos antioxidantes del orégano podrían estar relacionados con monoterpenoides fenólicos como son el carvacrol⁸⁷ y el timol^{88 89 90 91}.

1.4.5.1. EXTRACCIÓN DE ANTIOXIDANTES

Para la obtención de compuestos antioxidantes contenidos en el orégano, es preciso lograr su separación desde la matriz vegetal en la que se encuentran y la recuperación posterior a partir del medio en el que se hayan solubilizado. Puede considerarse: i) la extracción directa de compuestos que se disuelvan en el agente extractor o ii) la realización de una etapa adicional que logre la ruptura o separación de los compuestos objetivos que se encuentren enlazados en la pared celular.

El proceso de separación puede ser clasificado de acuerdo a la naturaleza del material extraído o clasificado por el tipo de fases en contacto, como sólido-líquido, líquido-líquido, entre otros. La separación de sustancias a partir de matrices vegetales se clasifica como extracción sólido-líquido⁹². Tal extracción es ampliamente usada para recuperar componentes, sin embargo, existen factores que afectan la concentración de los componentes deseados en el extracto sólido-líquido, como la temperatura, tasa de flujo y tamaño de las partículas; además de variables significativas como el tiempo de contacto, temperatura, agitación, potencia, tipo de solvente, entre otros.

Suele utilizarse un ácido junto a los solventes, el cual actúa rompiendo las membranas celulares, liberando antioxidantes, sin embargo este tratamiento químico severo puede romper la estructura de dichos antioxidantes. Por lo tanto, es de suma importancia acidificar los disolventes con el agregado de ácidos orgánicos (ácido fórmico o ácido acético) en lugar de ácidos minerales como el HCl⁹³. El etanol es uno de los disolventes más utilizados para la extracción de antioxidantes, ya que es: económico, reutilizable, no tóxico y los extractos pueden utilizarse en la industria alimentaria⁹⁴. El uso de mezclas hidroalcohólicas ha sido propuesta por diversos autores^{95 96 97}, debido a que la mezcla de etanol-agua permite un efecto sinérgico entre los disolventes. El agua actúa como un agente de hinchamiento de la matriz vegetal, aumentando la superficie de contacto, mientras que el etanol induce la ruptura del enlace entre los solutos y la matriz⁹⁸.

1.4.5.1.1. EXTRACCIÓN CONVENCIONAL

Este tipo de extracción incluye técnicas clásicas basadas en la capacidad de extracción de diferentes disolventes y/o aplicación de calor y agitación. Estos métodos de extracción tienen como ventaja el bajo costo del montaje de la unidad extractora y como desventaja, los altos tiempos de extracción, el uso de grandes cantidades de disolventes, su baja selectividad, la necesidad de realizar una etapa posterior de evaporación del disolvente y la posible descomposición de los compuestos lábiles⁹⁹.

1.4.5.1.2. EXTRACCIÓN NO CONVENCIONAL

En la búsqueda de nuevas técnicas de extracción, que resulten más amigables con el medio ambiente y que no representen riesgos para la salud, mientras facilitan la extracción de compuestos de interés, se han estudiado diferentes tecnologías como: fluidos a alta presión, tecnología de ultrasonido, tratamientos enzimáticos, tecnología de microondas y de pulso eléctrico⁹⁹.

El ultrasonido es la ciencia y tecnología de la aplicación de ondas de sonido con frecuencias superiores a la capacidad auditiva humana, es decir, 16KHz¹⁰⁰. Hoover¹⁰¹ define el ultrasonido como una forma de energía que viaja en ondas de sonido iguales o mayores a 20000 vibraciones por segundo. Actualmente el empleo de ultrasonido en el procesamiento de alimentos está basado en la ventaja que representa sobre los procesos tradicionales, al reducir tiempos de proceso y mejores atributos de calidad.^{102 103}.

Sobre la base del rango de frecuencia, el ultrasonido se clasifica ampliamente en dos, ultrasonido de potencia (sonoquímica) que tiene un rango de frecuencias de 20-100 kHz y ultrasonido de diagnóstico con frecuencia entre 5 y 10 MHz. La sonoquímica es la aplicación de ultrasonido en materiales, reacciones químicas y procesos, excluyendo aplicaciones médicas. La cavitación es el mecanismo principal de extracción del tratamiento ultrasónico. En este caso, las burbujas en la extracción líquido/sólido pueden colapsar explosivamente y generar presión localizada causando ruptura del tejido vegetal, mejorando la liberación significativa e incrementada tanto de los materiales intracelulares como de la pared celular que se difunden en el disolvente de extracción^{104 105 106}. Una de las

aplicaciones del ultrasonido es la intensificación de la extracción de compuestos bioactivos a partir de sustratos vegetales bajo condiciones atmosféricas, que requieren la inmersión de la muestra en un solvente líquido. Para generar ultrasonido, se usan comúnmente los transductores piezoeléctricos, ya que son compactos y relativamente económicos que vibran a una frecuencia particular, creando energía mecánica cuando se les suministra energía eléctrica^{107 108}.

1.5. HONGOS COMESTIBLES

Según el Codex Alimentarius, se entiende por hongos comestibles los frutos pertenecientes a un grupo vegetal específico “fungi” que crecen en estado silvestre o que se cultivan y que después de su elaboración necesaria son apropiados para utilizarse como alimento¹⁰⁹. Según el reglamento bromatológico nacional⁴¹, con el nombre genérico de hongos o setas se entiende el tejido celular de plantas acotiledóneas comestibles frescas o procesadas (Basidiomicetos, Himenomicetos y Gasteromicetos).

De acuerdo con el origen, los hongos comestibles se clasifican en: hongos silvestres comestibles (son aquellos colectados en la naturaleza y que crecen espontáneamente) y hongos comestibles de cultivo (son aquellos que se obtienen mediante prácticas de producción sembrando el micelio en sustratos específicos, debidamente pasteurizados o esterilizados). Pertenece a esta clasificación el género *Pleurotus* (*Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius*, *Pleurotus citrinopileatus*, *Pleurotus djamor*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus albidus* y *Pleurotus sajorcaju*).

Además de su un gran aporte nutricional, los hongos comestibles presentan un gran potencial biotecnológico debido a su capacidad de producir enzimas y fármacos, y de ser útiles en procesos de biorremediación, entre otros usos¹¹⁰. En la actualidad se conocen cerca de 14000 especies de hongos distribuidas en todo el mundo, de las cuales más de 3000 son consideradas comestibles. Hasta la fecha solamente unas 200 han sido cultivadas experimentalmente¹¹¹.

1.5.1. PLEUROTUS OSTREATUS

De todas las especies cultivadas, las del género *Pleurotus*, conocidas comúnmente como gírgola, orejas blancas, orejas de palo, orejas de cazahuate¹¹², presentan el mayor ritmo de evolución, crecimiento y expansión en todo el mundo, alcanzando con sorprendente rapidez, en menos de 30 años, el tercer lugar en las cifras de producción mundial de hongos comestibles, tras el histórico champiñón (*Agaricus bisporus*) y el shiitake (*Lentinula edodes*)^{113 114}. La razón de este crecimiento radica en que las especies de *Pleurotus* poseen una calidad organoléptica excelente y crecen de manera aceptable en diversos sustratos lignocelulósicos¹¹⁵.

Pleurotus ostreatus es considerado como uno de los hongos saprófito perteneciente a la clase *Basidiomycetes* más importantes no solo por su alto valor nutricional sino también por su amplia gama de metabolitos bioactivos lo que lo convierte en un alimento funcional con aplicaciones nutracéuticas^{116 117 118}.

El género *Pleurotus* comprende especies generalmente de color blanco, amarillento o rosado, a veces grisáceo oscuro. Su forma puede ser de embudo, pétalo de flor o concha de ostra. Las laminillas son longitudinalmente decurrentes sobre la base del estipe, con frecuencia anastomosadas transversalmente al nivel de la inserción del pie. Las esporas son de color blanco, crema o lila pálido, presentan una forma cilíndrica y son lisas. El género está distribuido en Europa, Asia, Australia y América¹¹⁵.

Además de sus características organolépticas, destaca su importancia a nivel nutricional ya que las setas pertenecientes a la especie *ostreatus* poseen más del 80 % de agua, son bajas en grasas y ricas en fibra dietética, presentan altos valores de determinados minerales y tienen alto contenido proteico. El alto valor nutritivo de su contenido nutricional (Tabla 1), genera un interés por los posibles beneficios entre estos componentes y la salud¹¹⁹.

Tabla 1: Contenido nutricional del hongo *Pleurotus ostreatus*¹²⁰.

Sustancia	%
Humedad (fresco)	92,20
Materia seca	7,80
Ceniza	9,50
Grasa	1,00
Proteína bruta	39,00
Fibra	7,50
Fibra cruda	1,40
Nitrógeno total	2,40
Calcio	33 mg/100 g
Fósforo	1,34 mg/100 g
Potasio	3793 mg/100 g
Hierro	15,20 mg/100 g
Vit.C	90-144 mg/100 g
Vit. B1	1,16-4,80 mg/100 g
Vit. B5	46-108,7 mg/100 g
Ácido fólico	65 mg/100 g

Hoy en día, a nivel terapéutico, existen investigaciones que avalan la existencia de compuestos funcionales como la quitina y los betaglucanos dentro de la fracción de fibra dietética de los hongos *Pleurotus*. Numerosos estudios atribuyen a estos polisacáridos propiedades medicinales como ser: función prebiótica, efectos antitumorales, inmunoestimulante, anticolesterolémico, antioxidante. La actividad antioxidante de los hongos deriva de su metabolismo secundario. En ellos se han encontrado compuestos como la ergotionina, los ácidos gálico y ascórbico, los tocoferoles y el selenio^{121 122 123 124 125}.

En animales se ha demostrado que el extracto de *Pleurotus* protege los órganos de ratas de más edad frente al estrés oxidativo y se han sentado las bases para poder probar la actividad de dichos extractos en humanos¹²⁶. Además, se sugirió incorporar a la dieta el extracto como suplemento nutricional para incrementar las defensas del cuerpo contra el estrés oxidativo¹²⁶.

1.5.2. PATÉ DE HONGOS

El paté se clasifica como un producto emulsionado hecho principalmente de hígado, grasa, carne o especias. Comúnmente se consume en todo el mundo debido a su textura rica y suave^{127 128 129}.

Para el caso de las pastas untables tipo “paté” a base de vegetales u hongos comestibles,

legalmente no se encuentra definido, pero comercialmente suena más atractivo hablar de “paté” que de “pasta untable” base. En este trabajo experimental el paté se elabora con hongos, siendo una versión que amplía la definición original hacia la utilización de otra materia prima.

Como se menciona en el apartado anterior, los hongos del género *Pleurotus* poseen características benéficas para la salud, por esta razón se decidió que en este trabajo experimental se trabajara con este alimento como ingrediente principal para la elaboración de los patés.

1.5.2.1. ESTRATEGIAS PARA AUMENTAR LA VIDA ÚTIL DEL PATÉ

En el presente trabajo se estudió la formulación de un paté de *Pleurotus ostreatus*. Para dicho fin, se evaluaron las siguientes estrategias para aumentar la vida útil: incorporar antioxidantes naturales al paté, aplicar mejores técnicas post cosecha al hongo y disminuir el pH del paté.

Como se mencionó anteriormente, los compuestos fenólicos en las hierbas son los componentes principales responsables de la eliminación de radicales libres (causantes del deterioro de la calidad de los alimentos), mediante la donación de un átomo de hidrógeno o un electrón para formar compuestos estables¹³⁰.

Los hongos en general y el género *Pleurotus* en particular, son muy perecederos debido a su composición, su alta tasa respiratoria y la transpiración muy rápida, entre otros factores que inducen a un veloz deterioro postcosecha. La aplicación de las mejores técnicas postcosecha sobre el hongo para prolongar su vida útil juega un rol importante en cuanto a su calidad. Cambios físicos, microbianos y mecánicos, pérdida de turgencia, deshidratación, pérdida de sustrato sólido y reacciones de pardeamiento limitan su vida comercial, por lo que es recomendable que éste se venda entre los 2 a 7 días siguientes de la cosecha, ya que tiende a deshidratarse. Además, se recomienda que en este lapso de tiempo permanezca refrigerado (1,5 °C)¹³¹. A fin de mejorar y ampliar la oferta de estos productos, es necesario estudiar cuáles parámetros facilitan o limitan la fabricación de productos elaborados a partir de estos hongos. En este sentido se consideró importante evaluar el proceso de escaldado.

El escaldado corresponde a un tratamiento térmico de alta temperatura y corto tiempo usado con el propósito de acondicionar la matriz alimenticia en diversos sentidos: ablandarlo para obtener un mejor llenado de los envases, inactivar enzimas deteriorantes (causantes de malos olores, malos sabores y fallas del color natural del producto) de modo que éstas detengan su actividad metabólica y cese la degradación del alimento¹³², producir otros efectos deseables como por ejemplo: eliminar aire del tejido, producir el cambio de volumen que típicamente se produce por contracción de la estructura, disminuir el contenido natural de microorganismos, lo cual facilita la pasteurización de conservas o reducir efectos indeseables como la pérdida de peso, preferentemente la asociada a la pérdida de nutrientes al medio de escaldado^{133 132}. La peroxidasa es una de las enzimas más resistentes al calor (hasta 70 °C), y su inactivación asegura la destrucción de otras más lábiles.

Como otra estrategia para aumentar la vida útil del paté, se busca disminuir el pH del mismo, aplicándosele al hongo con el cual se elabora, un proceso de escaldado. Se sabe que con la aplicación de los tratamientos de escaldado, se logra una disminución del pH del hongo y su mantenimiento es estable en el tiempo, siendo entonces un producto más seguro para el consumo humano¹¹⁵. Una acidez alta establece un medio no adecuado para el crecimiento de la mayoría de las bacterias ácido-tolerantes, levaduras y hongos. A su vez, el crecimiento de las mismas, es propicio en los alimentos que contienen alta actividad de agua (aw). Considerando que una ligera reducción del pH incrementa el límite de aw para el crecimiento bacteriano y, viceversa, se busca que la interacción pH - aw en aquellas temperaturas superiores a 71 °C sea suficiente para suprimir el crecimiento de la mayoría de las bacterias indeseadas.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la incorporación de compuestos bioactivos del orégano (*Origanum vulgare*) en el desarrollo de un paté de hongos funcional.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar la caracterización nutricional del orégano seco.
- Comparar las metodologías de extracción (convencional y mediante aplicación de ultrasonido) de compuestos antioxidantes presentes en el orégano mediante las técnicas de ABTS y Folin-Ciocalteu.
- Identificar los principales compuestos bioactivos presentes en los extractos obtenidos mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).
- Evaluar la incorporación de compuestos antioxidantes provenientes del orégano, utilizando las condiciones optimizadas anteriormente, en el desarrollo de un paté de hongos (*Pleurotus ostreatus*) con el fin de desarrollar un alimento funcional.
- Realizar un seguimiento de la estabilidad del paté de hongos por un período de 60 días a partir de su elaboración.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. EQUIPOS

Para la realización de este trabajo se utilizó balanza analítica Shimadzu®, Uni Bloc ATX224. Rotavapor IKA® RV, con baño de agua HB. En la determinación del contenido proteico total, se utilizó tubos de vidrio para Kjeldahl marca Tecator®, así como el digestor (Tecator® 1007 Digestion System) y el destilador (Tecator® 1002 Kjeltex System). Para la determinación de lípidos totales, se utilizó una estufa Edelstahl®, Rostfrei, el rack de planchas calefactoras donde los extractores se ensamblaron junto con el condensador Quimis®, Q.308.26. La mufla utilizada tanto para la determinación de minerales como para la determinación de fibra dietética total es de Thermolyne®, FA 1780. El filtro utilizado para la determinación de fibra es Tecator®, Fibertec. Mientras que el baño de agua es Stuart®, 230Vac. Para la realización de los extractos por ultrasonido, se utilizó un equipo Sonic®, Vibra Cell Processors VCX 500/VCX 750, todos los extractos fueron liofilizados en un liofilizador Bio base®, BK-FD10S. Para las determinaciones espectrofotométricas, se utilizó un lector de placas Thermo Scientific®, Multiskan FC. En la identificación de compuestos fenólicos se utilizó un equipo de HPLC-DAD Agilent Technologies®, 1260 Infinity, con una bomba G1311C, un inyector automático G1329B, un horno G1316A, y un detector de arreglo de diodos G1315D. Para el HPLC, se utilizó una columna de fase reversa Thermo Scientific BDS Hypersil. Los filtros para HPLC empleados fueron de 0,22 micras, Merk Millipore®. El mixer empleado en la realización de los patés fue Electrolux®. Se utilizaron tubos Eppendorf® de 1,5mL.

3.2. ORÉGANO

Se trabajó con orégano (*Origanum vulgare*) marca “Emigrante”, envasado y distribuido por PONTYN S.A. Al inicio de cada actividad experimental en donde se utilizó orégano seco como muestra, se verificó la integridad de los paquetes y se utilizó aquellos que se encontraran herméticos y sin exposición a la luz; con un contenido neto de 50 g de orégano seco comestible, de color y aroma característico.

Fecha de envasado: 08/2017 - Fecha de expiración: 08/2019.

Al realizar la operación de apertura de los paquetes, se tuvo especial cuidado de manejar las muestras de una forma limpia, ordenada y protegiendo el producto de factores externos, además de comprobar que las características organolépticas del orégano permanecieran incambiadas entre ensayos.

3.2.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ORÉGANO

3.2.1.1. CONTENIDO DE HUMEDAD

La humedad se determinó por el método UNIT- ISO 939: 1980.

Se transfirió el orégano a un balón de destilación al cual se le añadió el tolueno. Luego de montado el aparato de destilación, se calentó el balón a una temperatura de 200 °C, superior al punto de ebullición del tolueno (110,6 °C). La destilación transcurrió por 5 horas con un promedio de 100 gotas por minutos. Se realizó el ensayo por triplicado. Finalmente se midió el volumen de agua colectada en el tubo colector denominada trampa de Bidwell- Sterling.

El contenido de humedad se determinó según:

$$\frac{\text{Volumen promedio de agua recolectada (mL)} * 100}{\text{Promedio de masa inicial de muestra (g)}}$$

3.2.1.2. CONTENIDO DE PROTEÍNAS

Se determinó por el método de Kjeldahl - AOAC 920.105¹³⁴ con las siguientes modificaciones:

Se utilizó como catalizador sulfato de cobre, sulfato de potasio y ácido sulfúrico concentrado. La mezcla digerida se neutralizó con NaOH 33 % y se destiló posteriormente. El destilado se recogió en una solución de ácido bórico 4 % e indicador mixto (azul de metileno 0,2 % y rojo de metilo 0,2 %). Los aniones del borato así formados se titularon con

una solución valorada de HCl 0,3064 N para determinar el nitrógeno contenido en la muestra según:

$$\frac{\text{Gasto de HCl (mL)} * \text{Normalidad de HCl} * 14}{\text{Masa promedio de orégano (g)} * 10}$$

Una vez calculado cual fue el contenido de nitrógeno, el resultado se multiplicó por un factor F (en el caso de alimentos varios, F=6.25), para calcular que porcentaje de todo el nitrógeno correspondió a proteínas.

3.2.1.3. CONTENIDO DE LÍPIDOS

Se determinó el contenido de lípidos por método Soxhlet modificado¹³⁵.

Se colocó el orégano en un cartucho de papel de filtro Whatman No. 1, que se situó en el sifón de un extractor Soxhlet que se encontraba sobre un balón seco y vacío, previamente masado.

Se utilizó éter de petróleo calidad comercial como disolvente. Éste se calentó por encima de su punto de ebullición (60–80 °C) sobre un rack de planchas calefactoras y se verificó que la velocidad de condensación alcance unas 2-4 gotas por segundo.

Se llevó a cabo una extracción durante 6 horas, luego se evaporó el disolvente del matraz del extractor Soxhlet empleando un rotavapor. Posteriormente se enfrió el matraz en un desecador conteniendo sílice gel y se determinó la masa (método gravimétrico).

El contenido de lípidos se determinó según:

$$\frac{\text{Peso del balon luego de rotaevaporar (g)} - \text{Peso del balon inicial (g)}}{\text{Peso de muestra inicial (g)}} * 100$$

3.2.1.4. CONTENIDO DE FIBRA DIETÉTICA TOTAL

Se determinó por el método enzimático de Prosky modificado, AOAC 68,4:677-679¹³⁶.

Se muflaron 6 crisoles a 525 °C por una hora el día anterior a realizar el ensayo. A los mismos luego de ser llevados a temperatura ambiente, se les agregó celite y se colocaron en un horno a 130 °C por una hora hasta que su peso fue constante.

Cada muestra se gelatinizó con 0,10 mL de α -amilasa (*Sigma Aldrich A3306*), se ajustó el pH de las solución a $7,5 \pm 0,2$ mediante la adición NaOH 0,275 N. Luego se digirieron enzimáticamente con 0,1 mL de solución de proteasa (*Sigma Aldrich P3910*) 50 mg/mL y se ajustó el pH de las soluciones a 4,5 mediante la adición de HCl 0,325 M. Posteriormente se digirieron con 0,1 mL de amiloglucosidasa (*Sigma Aldrich A9913*). Se añadieron 4 volúmenes de 100 mL de etanol 95 %. Se distribuyó y humedeció la capa de celite colocada sobre el crisol utilizando etanol 78 % con el fin de formar una capa homogénea de celite. Se le aplicó succión suavemente y se transfirió cuantitativamente el precipitado de los vasos. A continuación, se le realizaron 3 lavados con 20 mL de etanol 78 %, etanol 95 % y acetona. Se colocó el residuo en una estufa a 105 °C durante 2 horas, se enfriaron los crisoles en un desecador con sílice gel con el fin de poder pesar los residuos y determinar el W2 descrito en la técnica.

De los seis crisoles utilizados, la mitad se destinaron para la cuantificación de proteínas por el método de Kjeldahl y el resto se incineraron para la cuantificación de minerales en una mufla a 525 °C por 8 horas.

Se calculó el contenido de fibra dietética total como:

$$\frac{\text{Masa promedio de residuo (g)} - \text{Masa promedio de proteínas (g)} - \text{Masa promedio de cenizas (g)}}{\text{Masa promedio de muestra (g)}} * 100$$

3.2.1.5. CONTENIDO DE MINERALES

Se determinó el contenido de minerales por incineración del orégano a $525 \text{ °C} \pm 15 \text{ °C}$ según el método de AOAC¹³⁴ con modificaciones.

El orégano se colocó en un crisol de porcelana previamente muflado. Luego, el orégano fue incinerado hasta que ya no se observó el desprendimiento de humo blanco. Posteriormente el crisol fue llevado a temperatura ambiente en un desecador conteniendo sílice gel. Luego,

se calcinó la muestra en mufla por 8 horas a 525 °C. Finalmente, se pesó la misma luego de que alcanzó la temperatura ambiente.

El contenido de minerales se determinó según:

$$\frac{\text{Masa del crisol con muestra luego de muflado}(g) - \text{Masa del crisol inicial sin muestra}(g)}{\text{Masa de muestra inicial}(g)} * 100$$

3.2.1.6. CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS

La cuantificación del contenido de carbohidratos en el orégano se determinó por diferencia restándole al 100 %, el porcentaje correspondiente al contenido de humedad, nitrógeno, lípidos, fibra y minerales presentes en el orégano.

3.2.2. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE ORÉGANO

La obtención de compuestos fenólicos con potencial bioactivo a partir de orégano se realizó mediante extracción asistida por ultrasonido y extracción convencional con solvente (70 % EtOH, 25 % H₂O, 5 % ácido fórmico) y agitación.

Para la optimización del proceso de extracción se realizó un diseño factorial central compuesto (Stuart Hunter & Hunter) (Tabla 2), siendo los factores la Potencia (W) y el tiempo de reacción (expresado en minutos) en dos niveles (100 y 0 W; 60 y 20 min) respectivamente, a su vez los tres puntos centrales estudiados fueron (50 W y 40 min). Todas las condiciones se detallan en la Tabla 2. Como variable respuesta se determinó el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante frente a radicales ABTS.

A su vez se mantuvo constante: el pH (2,5), la temperatura (25 °C) y la relación masa orégano - volumen solvente (1:10). Los sistemas 3 y 4 se sometieron a agitación mecánica (convencional) durante 20 y 60 minutos respectivamente. Los sistemas 1, 2, 5, 6 y 7 se obtuvieron a partir de la extracción por ultrasonido (Figura 10).

Tabla 2: Diseño factorial central para el proceso de extracción

Ensayo	Factores	
	potencia	tiempo
1	100	20
2	100	60
3	0	20
4	0	60
5	50	40
6	50	40
7	50	40

Posteriormente a la extracción, las muestras se filtraron utilizando papel de filtro Whatman No. 1. Cada solución de filtrado se evaporó utilizando un evaporador rotatorio de vacío a una temperatura de 60 °C, 200 rpm, luego fue liofilizado y almacenado a -20 °C hasta su posterior análisis.



Figura 10: Ultrasonido utilizado en el laboratorio equipo SONICS®, modelo Vibra Cell Processors VCX 500/VCX 750.

3.2.2.1. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

El ensayo se fundamenta en la capacidad de un antioxidante para estabilizar el radical catión coloreado ABTS^{•+} y en la cuantificación de la decoloración del mismo (desaparición del color azul/verde). El método mide la decoloración de la solución conteniendo el radical libre y la muestra, debido a la captura del radical. Este comportamiento se observa en una disminución de absorbancia que se corresponde cuantitativamente con la concentración de antioxidantes presentes en la muestra¹³⁷. Es decir, el descenso de color producido por el

Trolox (análogo sintético de la vitamina E), es comparado con el producido por el antioxidante que se está analizando simultáneamente¹³⁸.

El radical catiónico $ABTS^{+\cdot}$ es un cromóforo que absorbe a una longitud de onda de 750 nm y se genera por una reacción de oxidación del ABTS (2,2'-azino-bis- (3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio) con persulfato de potasio (Figura 11).

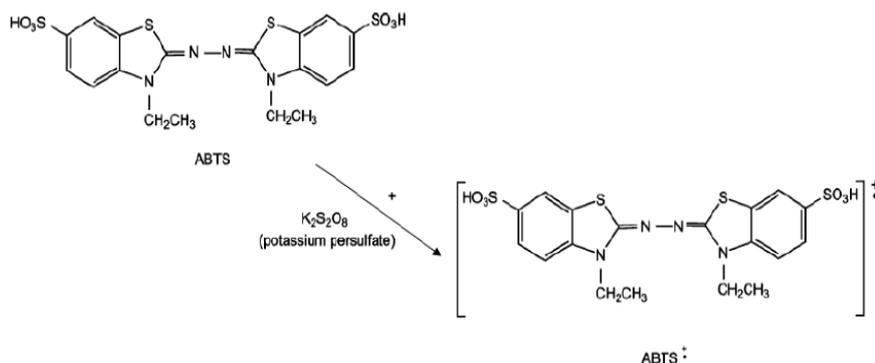


Figura 11: Formación del radical catiónico $ABTS^{+\cdot}$ generado por la reacción del ABTS con persulfato de potasio $K_2S_2O_8$ ¹².

La ventaja de este ensayo es que puede utilizarse tanto en muestras hidrosolubles como liposolubles, eligiendo el disolvente apropiado en cada caso y que proporciona rápidamente los resultados más reproducibles empleando un espectrofotómetro. Además, este método es particularmente interesante para el estudio de extractos vegetales ya que la longitud de onda a la que se realizan las medidas de absorbancia no interfiere en el color de los mismos¹².

En este trabajo experimental, para la determinación de la capacidad antioxidante de los extractos de orégano, se utilizó el método descrito por Re et al¹².

Se preparó una solución stock de ABTS 7 mM a la que se le añadió persulfato potásico 140 mM con el fin de activar la solución de ABTS y se incubó a temperatura ambiente, en la oscuridad, durante 18 horas para la formación del radical. A partir de ésta se obtuvo, por dilución en tampón fosfato sódico una solución de trabajo de ABTS cuya absorbancia a 750 nm fue llevada y fijada en 0,7.

Cada muestra se preparó en una concentración de: 0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,8 mg/mL y 1,0 mg/mL. Tanto las muestras como el estándar, se diluyeron usando tampón fosfato sódico (PBS) 5 mM, pH 7,36. Se dejó reaccionar una mezcla de muestra o estándar

con 190 µL de la solución de trabajo de ABTS en oscuridad, a temperatura ambiente, durante 10 minutos. Finalmente, se determinó la absorbancia en un lector de placas a 750 nm.

Se elaboró una curva de calibración usando el reactivo de Trolox (ácido 6-hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) como sustancia patrón. El mismo se utilizó en las siguientes concentraciones: 0,25 mM, 0,5 mM, 0,8 mM, 1,0 mM, 1,2 mM, 1,5 mM.

El porcentaje de inhibición de la absorbancia se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \left(\frac{\text{Abs corte con eje y} - \text{Abs muestra o patrón}}{\text{Abs corte con el eje y}} \right) * 100$$

Se construyeron las curvas de % Inhibición vs [muestra] (mg/mL) de donde se obtuvo la función logarítmica y se despejó el valor de [muestra] para un 50 % de inhibición de radicales ABTS.

La capacidad antioxidante se expresó como IC50. Este parámetro refleja la cantidad de antioxidante necesaria para atrapar el 50 % de la concentración inicial de radicales ABTS. Por lo tanto, se interpreta que a un valor menor de IC50, mayor es la capacidad antioxidante.

Se obtuvieron las medidas de absorbancia de todas las muestras y se interpolaron en la curva de calibración para calcular la actividad antioxidante de las muestras, expresadas como µmoles Trolox/10 µL muestra. Posteriormente, se ajustó por el factor de dilución de cada ensayo y el factor de correlación utilizado, para finalmente ser expresados los resultados como mmoles TE (Equivalentes de Trolox)/g de orégano seco.

3.2.2.2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES

La determinación del contenido de polifenoles totales de los extractos de orégano, se realizó con el método de Folin-Ciocalteu propuesto por Singleton et al¹³. Este método es utilizado en la determinación del contenido de fenoles totales presentes en un alimento. El análisis se basa en la reducción de los fenoles totales por una mezcla de ácidos: fosfotúngstico y fosfomolibdico¹³, lo que genera una mezcla de óxidos de tungsteno y molibdeno¹³⁹. Los

metales tienen un estado de oxidación 6, pero durante la reacción, en medio básico, hay una reducción a un estado de oxidación entre 5 y 6 que se acompaña de un cambio en el color de amarillo hacia el azul. Este fenómeno, apoya la idea de que la reacción se produce a través del mecanismo de transferencia electrónica. El cambio aumenta cuanto mayor sea el contenido en compuestos fenólicos¹⁴⁰.

Es relevante mencionar que el reactivo de Folin-Ciocalteu (FCR) no es específico de los compuestos fenólicos, ya que puede ser reducido por muchos compuestos no fenólicos, por ejemplo, vitamina C, Cu (I), etc. Los compuestos fenólicos reaccionan con el FCR solo en condiciones básicas (ajustados por una solución de carbonato de sodio a pH aproximadamente de 10). A pesar de la naturaleza química indefinida del FCR, el análisis de fenoles totales por Folin-Ciocalteu, es conveniente, simple y reproducible. Como resultado, se ha acumulado una gran cantidad de datos, y se ha convertido en un ensayo de rutina en el estudio de los antioxidantes fenólicos^{1 140}.

En este ensayo, los extractos obtenidos a partir de cada sistema se dispersaron en agua destilada con una concentración de: 1 mg/mL. La decisión de utilizar esta concentración se originó a partir del amplio conocimiento en las técnicas donde se aplicó la ley de Beer-Lambert para este tipo de análisis y sobre matrices vegetales. Dicha concentración caía dentro de la curva de calibración del método y por lo tanto fue posible interpolar las muestras dentro la misma.

En una placa de 96 pocillos se agregó la solución patrón o muestra en cada pocillo por cuadruplicado, a estos, se le añadió carbonato de sodio al 20 %, se esperaron 2 minutos y se le agregó solución de Folin-Ciocalteu (1/5). Se mantuvo en oscuridad y temperatura ambiente por 30 minutos y se midió la absorbancia a 750 nm.

El contenido de compuestos fenólicos se expresó como: mg ác gálico/g de muestra. Se utilizó una curva de calibración con ácido gálico como estándar en las siguientes concentraciones: 0,05 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,8 mg/mL, 1,0 mg/mL.

3.2.2.3. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN EL ORÉGANO.

Se realizó la identificación de compuestos fenólicos en el orégano mediante la cuantificación por HPLC (High Performance Liquid Chromatography) según el método descrito por Reza et. al.¹⁴¹. Debido a su precisión y versatilidad, este método es comúnmente utilizado para el análisis de carotenoides y compuestos fenólicos^{142 143 144}. Una de las desventajas del método de HPLC es el límite de detección y la sensibilidad en matrices complejas, como son los extractos de plantas crudas, los cual contienen una inmensa variedad de compuestos en disolución.

La solución para la identificación de compuestos fenólicos se preparó calentando 100 mL de ácido cítrico hasta ebullición, al cual posteriormente se le añadió 10 g de orégano seco. Éste se mantuvo con agitación constante en ebullición durante 5 minutos y luego se coló el orégano utilizando papel de filtro Whatman N° 1 para continuar trabajando con el ácido cítrico conteniendo los extractos de la muestra. La solución resultante se llevó a temperatura ambiente y se filtró mediante filtros de 0.22 micras en viales aptos para HPLC.

Se inyectaron 20 µL de la muestra a una concentración de 0,1 g/mL, con un flujo de 1 mL/min en un HPLC acoplado a un detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD), empleando una columna de fase reversa C18 (150 x 3 mm, tamaño de partícula 3 µm), y una fase móvil constituida por MeOH: ACN: ácido fosfórico (pH 2,81) en una modalidad de gradiente de elución descrito en la Tabla 3.

Tabla 3: Gradiente de elución en las condiciones analíticas del HPLC.

Tiempo (min)	0	10	20	30	45	47	50	55
ACN (%)	5	10	20	20	100	100	5	5
MeOH (%)	0	10	20	20	0	0	0	0
H₃PO₄ (%)	95	80	60	60	0	0	95	95

Nota: Se indica para cada tiempo el porcentaje de ACN (Acetonitrilo), MeOH (metanol) y H₃PO₄ (ácido fosfórico).

Se identificaron y cuantificaron los siguientes compuestos utilizando curvas de calibración (concentraciones entre 0,01 y 1,00 mg/mL) con sus respectivos tiempos de retención (tr)

expresados en minutos: ácido gálico (tr: 5,42), ácido caféico (tr: 12,50), ácido clorogénico (tr: 13,69), rutina (tr: 19,05) y quercetina (tr: 25,45). El sistema de procesamiento de datos que se utilizó fue el software Dionex Chromeleon 7.1 SR2.

3.3. DESARROLLO DE UN ALIMENTO FUNCIONAL UTILIZANDO ORÉGANO COMO FUENTE DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

Se desarrolló un paté de hongos, para lo cual se trabajó en dos etapas: en una primera etapa se realizó un escaldado del hongo, el cual fue utilizado para la elaboración del paté. Luego, en una segunda etapa, se le incorporó orégano al paté con el fin de incrementar sus propiedades antioxidantes y convertirlo en un alimento funcional. Además se buscó incrementar la vida útil del paté.

3.3.1. ESCALDADO DEL PATÉ DE HONGOS

Como se mencionó anteriormente en el punto 1.5.2.1., los hongos son muy perecederos debido a su composición, su alta tasa respiratoria y la transpiración muy rápida, entre otros factores que inducen a un veloz deterioro postcosecha. En este sentido se consideró importante evaluar el proceso de escaldado.

La solución de escaldado se preparó teniendo en cuenta la relación 1 kg de hongos en 3 L de ácido cítrico 0,5 %, pH 2,47. Esta relación es recomendada según bibliografía consultada¹¹⁵¹³³. En adelante cuando se mencione al ácido cítrico, se hace referencia al utilizado para el escaldado.

3.3.2. FORMULACIÓN DEL PATÉ

El pate se elaboró con hongos *Pleurotus ostreatus*, marca “Granja Amanecer”, provistos en bandeja de polietileno (icopor), recubiertos con film y almacenados en refrigeración a 4 °C. Además, contenía cebolla, aceite de girasol (alto oleico), sal, pimienta blanca y ácido cítrico 0,05 %.

En cuanto a la preparación, se cortaron los hongos en trozos de 2 cm² descartándose las partes duras. Por otro lado, se picaron las cebollas en trozos pequeños de 1 cm²

aproximadamente. Se calentó ácido cítrico en una olla hasta ebullición en la cual se incorporaron los hongos y se calentaron durante 5 minutos con agitación. A continuación, se retiraron y colaron con el fin de quedar desprovistos de ácido. Se fritó la cebolla en 3 cucharadas de aceite hasta que apenas se doraron. Luego se integró el hongo, la cebolla, la sal y la pimienta. La mezcla se procesó con mixer hasta que se formó una pasta blanda sin grumos, con las características de un paté.

3.3.3. INCORPORACIÓN DEL ORÉGANO EN EL PATÉ DE HONGOS

Para la elaboración del paté con orégano, se utilizaron los mismos ingredientes y receta que para el paté de hongos sin orégano, con la salvedad de que se incorporó orégano seco según se explica a continuación:

Se calentó el ácido cítrico hasta ebullición junto al orégano seco (relación 1:10 masa orégano – volumen ácido cítrico). Esta preparación se mantuvo durante 5 minutos y a continuación se retiró el orégano seco con un colador, de manera que se pudiera continuar trabajando con el ácido cítrico conteniendo los extractos del orégano. De la solución colada se tomó una alícuota de 15 mL para medir propiedades antioxidantes y compuestos fenólicos totales posteriormente.

A la solución de ácido cítrico resultante que permanecía en ebullición, se agregaron los hongos en la proporción descrita anteriormente. Transcurridos 5 minutos, los mismos fueron retirados y escurridos para ser luego utilizados como materia prima principal para el paté. Se guardó otra alícuota de 15 mL de la solución del ácido cítrico restante.

Las alícuotas de ácido cítrico obtenidas fueron liofilizadas y conservadas a -18 °C para su posterior análisis.

El proceso es esquematizado según el siguiente diagrama de flujo (Figura 12):

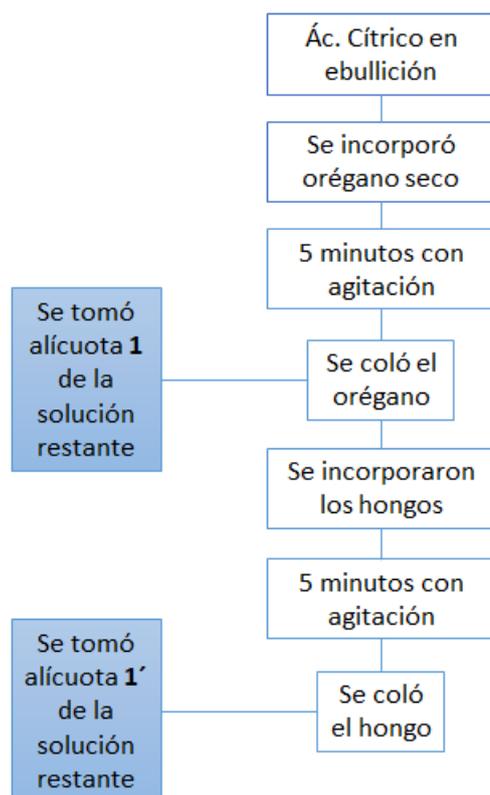


Figura 12: Diagrama de flujo. Se indican los puntos del proceso en donde se tomaron las muestras 1 y 1' para su posterior análisis

3.3.4. ALMACENAMIENTO DEL PATÉ DE HONGOS

Se utilizaron bollones de vidrio con tapas herméticas para el almacenamiento del paté. Para la desinfección de los mismos, se introdujeron en una olla con agua hirviendo donde permanecieron por 15 minutos hasta segundos antes de introducir el paté de hongos.

En cuanto al envasado, se tuvo especial cuidado en evitar que quedaran burbujas de aire entre el vidrio y el paté. Para realizar la esterilización de cada bollón conteniendo paté, éste se colocó (con la tapa sin ajustar completamente) en una olla con agua a un nivel suficiente para cubrir el contenido de paté, luego se calentó hasta ebullición y en ese momento se dejaron transcurrir 10 minutos teniendo especial cuidado de que no entrara agua a ningún bollón. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, cada paté fue refrigerado a 4 °C y en oscuridad hasta su uso.

3.3.5. ESTUDIO DEL EFECTO DEL HONGO FRENTE A LOS ANTIOXIDANTES PROVENIENTES DEL ORÉGANO

Según se describe en el diagrama de flujo expuesto en el punto 3.3.3., durante la elaboración del paté se tomaron alícuotas de la solución de ácido cítrico.

Las alícuotas 1 y 1' fueron liofilizadas y permanecieron a -18 °C hasta su utilización en los ensayos de Folin-Ciocalteu y ABTS, con el fin de evaluar la incorporación de compuestos fenólicos presentes en el orégano al hongo. Además, se determinó si el proceso de escaldado tuvo efectos sobre la capacidad antioxidante del paté.

Se utilizaron las siguientes concentraciones para el ensayo de ABTS: 0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,8 mg/mL, 1,0 mg/mL y 5,0 mg/mL a partir del liofilizado correspondiente diluido en una solución de ácido cítrico. Para el ensayo de Folin-Ciocalteu se utilizó una concentración de 1 mg/mL.

3.3.6. CARACTERIZACIÓN Y ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DEL PATÉ DE HONGOS

A cada paté se le determinó su actividad antioxidante, la cantidad de compuestos fenólicos presentes, el pH y su color. Todas estas determinaciones se realizaron los días 1, 30 y 60 posteriores a la elaboración de los pates, los cuales permanecieron cerrados y estériles.

Dada la textura de un paté, con el fin de facilitar la manipulación de las muestras a la hora de realizar los análisis, fue necesario realizar el siguiente proceso: a 10 g de paté pesados en un tubo Falcon de 50 mL, se le añadieron 10 mL de una solución de ácido cítrico al 0,5 %. Éste sistema, fue homogenizado en plancha magnética durante 20 minutos y posteriormente se centrifugó con el fin de obtener el sobrenadante, el cual se colocó en un tubo Falcon de 15 mL. Se obtuvo por lo tanto una muestra líquida de muy fácil manipulación que fue conservado a -20 °C hasta su uso.

3.3.6.1. DETERMINACIÓN DEL COLOR

En 1986 la International Commission on Illumination (CIE) estableció uno de los métodos de evaluación del color de más amplio uso en alimentos conocido como CiELab, basándose en la determinación de valores triestímulo que permiten definir cada color a partir de unas coordenadas denominadas L^* , a^* y b^* , y además se cuantificó los parámetros c^* y H^* . El eje vertical L^* es una medida de la luminosidad, y varía desde completamente opaco (valor 0) a completamente transparente (valor 100). En los ejes de tonalidad, a^* es una medida de la intensidad de color rojo (+) o verde (-), b^* de la intensidad de color amarillo (+) o azul (-), c^* representa la saturación (comenzando en 0 en el eje de luminosidad) y H^* como el ángulo de matiz (el ángulo de matiz comienza en el eje $+a^*$ y se expresa en grados) (C.I.E, 1986)¹⁴⁵.

3.3.6.2. MEDICIÓN DE pH

Se utilizó un pHmetro de inmersión. El mismo, se calibró antes de realizar la medida con soluciones patrón de pH 10, 7 y 4.

3.3.6.3. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES PRESENTES EN EL PATÉ

Se determinó la capacidad antioxidante y los compuestos fenólicos totales presentes en cada paté utilizando las técnicas de ABTS y Folin-Ciocalteu citadas en los puntos 3.2.2.1. y 3.2.2.2 respectivamente.

3.3.6.3.1. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN EL PATÉ DE HONGO

Se utilizó exactamente la misma metodología y condiciones del análisis por HPLC para el orégano descritas en el punto 3.2.2.3., con la salvedad de que las muestras utilizadas correspondían al sobrenadante final de la muestra obtenida según la metodología descrita en el punto 3.3.6.

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico fue realizado mediante el programa Infostat y Statgraphics Plus 5.1. Los resultados fueron analizados mediante un estudio de análisis de varianza (ANAVA) y se consideraron diferencias significativas con niveles de significación de 0,05. Éstos fueron expresados como el promedio \pm desviación estándar. Las diferencias significativas de las medias fueron evaluadas mediante el ensayo de comparación de Tukey.

Todos los análisis citados en este trabajo experimental se realizaron al menos por triplicado.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DEL ORÉGANO

Los valores resultantes de la caracterización de la muestra pueden ser observados en la Tabla 4:

Tabla 4: Composición nutricional del orégano

Humedad	6,93 ± 1,27
Proteínas	9,08 ± 0,73
Lípidos	4,78 ± 0,39
Minerales	12,00 ± 0,74
Carbohidratos	28,69 ± 3,32
Fibra total	38,59 ± 0,19

Nota: Los resultados se expresan en % en base seca de orégano como el promedio ± desviación estándar.

Para caracterizar la composición del producto vegetal, dentro de los análisis realizados se excluyeron algunos elementos traza que no resultan relevantes para la realización de esta tesis y que generalmente se informan en otros alimentos, tales como vitaminas, sodio/potasio, así como también la discriminación entre grasas totales, trans y saturadas, entre otros.

El contenido de agua en los alimentos, la forma molecular, y su localización dentro del producto alimenticio, son factores que afectan de modo significativo a características específicas como apariencia, textura, color, etc. En este trabajo, se obtuvo un contenido de humedad de aproximadamente 7 %. Cabe mencionar que se utilizaron muestras deshidratadas de la hierba.

Las proteínas totales se encontraron en una proporción de un 9 %, dicho valor es exactamente el mismo al expresado en bibliografía¹⁴⁶. En comparación con otros alimentos de una dieta básica equilibrada, el contenido de proteínas del orégano seco fue comparativamente bajo.

El resultado del ensayo de contenido de lípidos en el orégano fue significativamente menor con respecto a las demás características nutricionales, encontrándose en el entorno de 4,8 %.

Al igual que para el caso de las proteínas, la cantidad de orégano ingerida habitualmente en la dieta no aporta cantidades significativas de lípidos.

El contenido de cenizas totales halladas fue de un 12 %, las cuales constituyen el contenido de minerales en el alimento. Según bibliografía, los principales minerales contenidos en el orégano seco son: potasio, calcio, magnesio, fósforo y hierro¹⁴⁷.

Los carbohidratos en la muestra fueron hallados por diferencia aritmética respecto al resto de los nutrientes, obteniéndose un valor de 28,7 %. El valor hallado en este trabajo experimental se asemeja al encontrado en bibliografía¹⁴⁶, donde el contenido total de carbohidratos es repartido mayoritariamente entre almidón (17,54 %), fructosa (1,13 %) y sacarosa (4,09 %).

Resta mencionar que la fibra se encontró en mayor proporción con respecto al resto de los componentes en la composición del orégano seco, siendo cercano a un 38 %.

Cabe destacar que considerando la variabilidad que se presenta en un material vegetal de diversos orígenes y expuesto a condiciones ambientales muy dispares, se puede considerar que los valores encontrados están en línea con los informados en la bibliografía^{146 147 148 149 150}. Todos los valores se encontraron dentro de las cantidades máximas y mínimas descriptas en el reglamento bromatológico nacional⁴¹ y con United States Department of Agriculture (USDA)¹⁴⁶.

4.2. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE ORÉGANO

Se realizó cada uno de los ensayos de extracción descriptos en la Tabla 2 y se obtuvo el rendimiento de extracción para cada liofilizado correspondiente a su ensayo (Tabla 5).

Tabla 5: Rendimiento de extracción en % para los liofilizados.

Ensayo	Condiciones de extracción	Rendimiento del liofilizado (%)
1	100 W, 20 min	20,4 ^a
2	100 W, 60 min	23,9 ^a
3	0 W, 20 min	17,8 ^a
4	0 W, 60 min	19,8 ^a
5	50 W, 40 min	23,1 ^a
6	50 W, 40 min	20,4 ^a
7	50 W, 40 min	20,9 ^a

Nota: Las letras iguales representan que no existen diferencias significativas entre las medidas del rendimiento de extracción por el test de Tukey ($p < 0,05$).

Se observó que el rendimiento de extracción para todos los extractos fue de un valor cercano a un 20 %, lo que resulta coherente con lo esperado teniendo en cuenta el tipo de matriz vegetal utilizada (con un porcentaje de fibra de alrededor de un 40 %), así como también las condiciones de extracción.

A pesar que la diferencia en el rendimiento de extracción entre ensayos no fue muy amplia, claramente existió una correlación positiva con el uso del ultrasonido. Este comportamiento era de esperar dado que otros trabajos citados han comprobado que la extracción ultrasónica proporciona mayores rendimientos de extracción, obteniéndose por la tanto, mayor contenido de liofilizado¹⁵¹.

4.2.1. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La capacidad antioxidante de los 7 ensayos anteriormente descritos, fue determinada mediante valores de IC50 (Tabla 6).

Tabla 6: Capacidad antioxidante presentes en los 7 extractos.

Ensayo	IC50 (mg/mL)
1	0,40 ± 0,02 ^a
2	0,36 ± 0,01 ^b
3	0,43 ± 0,01 ^a
4	0,36 ± 0,21 ^b
5	0,38 ± 0,01 ^b
6	0,38 ± 0,01 ^b
7	0,37 ± 0,02 ^b

Nota: los resultados se expresan como el promedio ± desviación estándar. Las letras diferentes representan diferencias significativas entre las medidas de ABTS por el test de Tukey ($p < 0,05$).

Como se puede apreciar en la Tabla 6, los valores de IC50 fueron mayormente afectados por el parámetro tiempo que por el método de extracción, ya que el ensayo 3, en el que la muestra fue agitada durante 20 minutos y el ensayo 1 en el que se aplicó ultrasonido por 20 minutos, fueron los que mostraron valores más altos de IC50, siendo los mismos de 0,43 y 0,40 mg/mL respectivamente. Estos valores son similares a los mencionados en bibliografía^{74 72}, donde utilizan procesos de extracción muy similares a los realizados en este trabajo. Dado que a mayores valores de IC50, menor es la capacidad antioxidante que posee la muestra, ambos ensayos son los que manifiestan significativamente menor capacidad antioxidante con respecto al resto de los ensayos.

Se realizó un gráfico de superficie de respuesta utilizando el programa Statgraphics Plus 5.1 para los 7 ensayos descritos en la Tabla 2 (Figura 13), utilizando al tiempo (minutos) y la potencia (watts) como variables independientes y como variable dependiente (variable respuesta) se tomó en cuenta la capacidad antioxidante IC50 (mg/mL).

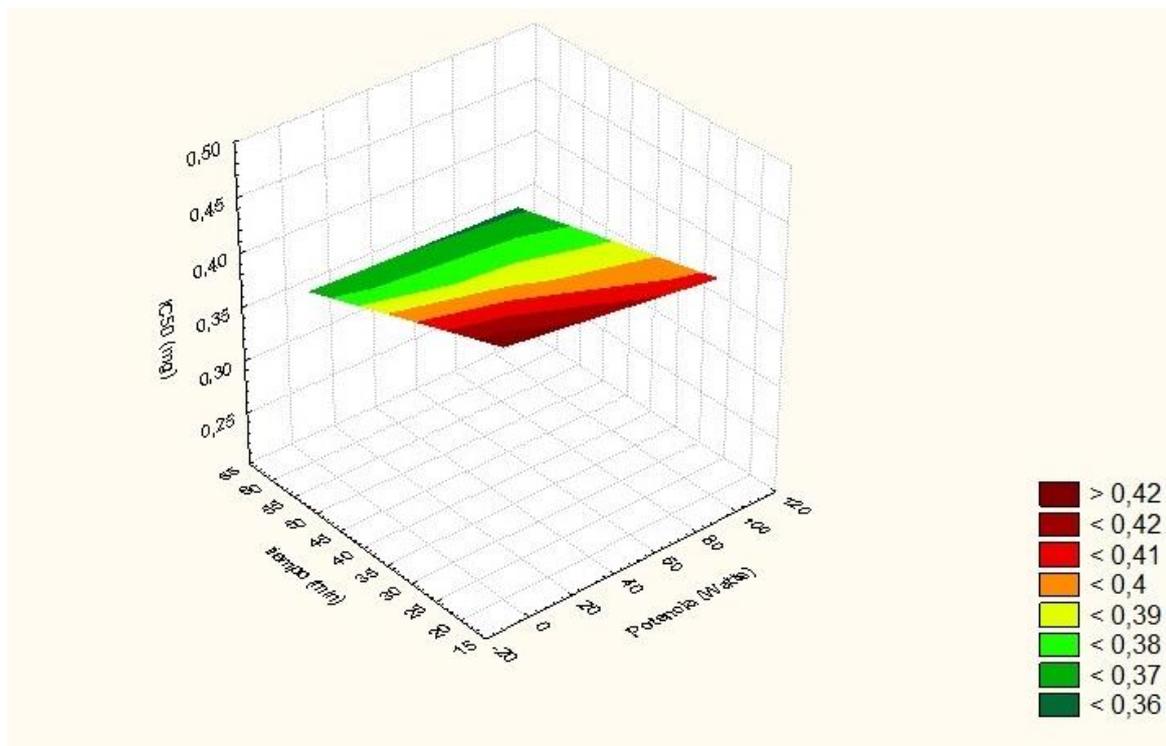


Figura 13: Gráfico de superficie de respuesta de capacidad antioxidante frente a radical ABTS.

El gráfico de superficie indica que existió una mejora en la extracción de compuestos antioxidantes a mayor tiempo de extracción. Sin embargo, no hubo una mayor respuesta en la extracción de los mismos al aplicar ultrasonido a mayores potencias. Este comportamiento concuerda con la Tabla 6, la cual revela la existencia de una diferencia significativa en la determinación de compuestos antioxidantes entre los ensayos que fueron sometidos a menor tiempo de extracción con respecto al resto de los ensayos.

De acuerdo al diseño experimental propuesto en el presente estudio, se esperaba que los ensayos 3 y 4 fueran los que tuvieran menor capacidad antioxidante ya que los métodos de extracción fueron los menos drásticos al utilizar solamente la agitación como fenómeno físico de extracción. A su vez, era de esperar que los ensayos 1 y 2 fueran los que obtuvieran mayor capacidad antioxidante al ser ellos sometidos al proceso de ultrasonido a máxima potencia. De acuerdo a los resultados expuestos anteriormente, se pudo observar que no se cumplió con la premisa de que la utilización de un proceso de extracción mediante ultrasonido mejore la eficiencia del mismo. Se concluye que la variable tiempo fue la que impactó en los resultados obtenidos.

4.2.2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES

Se obtuvo el valor de la cantidad de compuestos fenólicos totales para cada uno de los extractos de acuerdo a la Tabla 2. En la Tabla 7 se pueden visualizar estos resultados, así como también las condiciones de extracción de manera resumida para cada ensayo.

Tabla 7: Cuantificación de compuestos fenólicos presentes en los 7 ensayos.

Ensayo	Condiciones de extracción	mg EAG/g
1	100 W, 20 min	7,51 ± 0,50 ^a
2	100 W, 60 min	9,33 ± 0,05 ^b
3	0 W, 20 min	7,63 ± 0,06 ^a
4	0 W, 60 min	9,31 ± 0,34 ^b
5	50 W, 40 min	8,92 ± 0,36 ^b
6	50 W, 40 min	9,36 ± 0,34 ^b
7	50 W, 40 min	9,14 ± 0,36 ^b

Nota: La cantidad de compuestos fenólicos se determinó como mg de equivalente de ácido gálico/g de orégano en base al peso seco (mg EAG/g). Estos valores se expresan como el promedio ± desviación estándar. Las letras diferentes representan diferencias significativas entre las medidas de compuestos fenólicos por el test de Tukey ($p < 0,05$).

Al igual que el punto anterior se realizó un gráfico de superficie de respuesta para los 7 ensayos descritos. Se tomó como variable dependiente el resultado de compuestos fenólicos que presentaron los extractos (Figura 14).

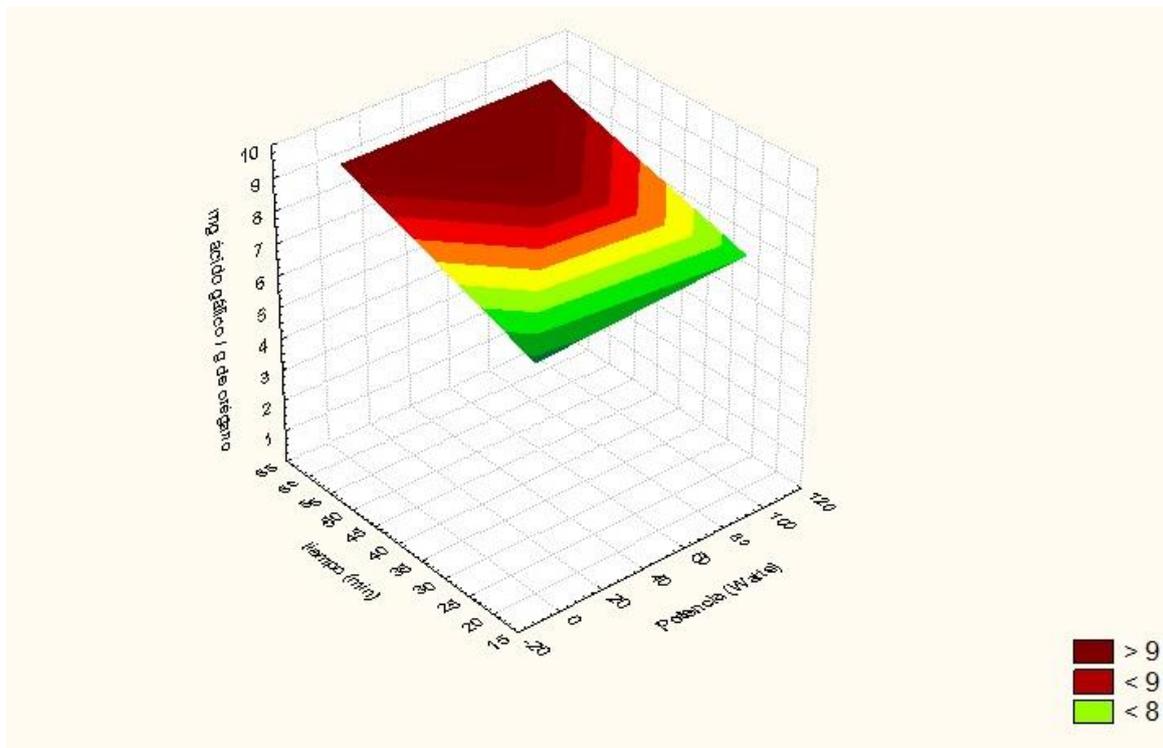


Figura 14: Gráfico de superficie de respuesta de cantidad de compuestos fenólicos.

Los resultados correspondientes a los ensayos 1 y 3 arrojaron menor cantidad de mg de equivalentes de ácido gálico/g de orégano, es decir menor concentración de polifenoles totales, con valores comprendidos entre 7,51 y 7,63 mg EAG/g. Estos valores son muy similares a los encontrados en bibliografía¹⁰⁸, donde se citan valores aproximados de 7 mg EAG/g de orégano, utilizando también ultrasonido para la extracción de compuestos fenólicos. Los resultados encontrados en este trabajo fueron superiores al contenido de compuestos fenólicos presentes en los siguientes alimentos: romero, palta, uva, clavo de olor y perejil que según bibliografía, contienen: 0,13 mg EAG/g de romero, 0,33 mg EAG/g de palta, 1,17 mg EAG/g de uva, 1,4 mg EAG/g de clavo de olor, 2,92 mg EAG/g de perejil, respectivamente^{42 152 153}.

La cantidad de compuestos fenólicos encontrados entre los diferentes ensayos descritos en la Tabla 7 y la Figura 14 son independientes del método de extracción utilizado. Se percibió que a menor tiempo de extracción, menor cantidad de compuestos fenólicos presentó el extracto. Este comportamiento concuerda con los resultados descritos en el trabajo de Liliana Santos-Zea¹⁰⁸, quien plantea que no existe diferencia significativa en la extracción de polifenoles totales en el orégano aplicando la técnica de ultrasonido. En su trabajo, indica que durante la extracción deben considerarse una serie de variables que están directamente

relacionadas con la eficiencia y el rendimiento del proceso, que incluyen el tiempo, temperatura, tipo y concentración del disolvente, potencia a aplicar y particularmente, el modelo y tipo de ultrasonido¹⁵⁴.

Por lo expuesto hasta aquí, se deduce que la cantidad de compuestos fenólicos que contenía la muestra luego del proceso de extracción correspondiente, fue dependiente del tiempo y no del método de extracción per se. De acuerdo a Selin Sahin¹⁵⁵, el proceso de extracción puede alcanzar hasta un 90 % de recuperación en los primeros 10-20 min, denominando a este periodo como etapa de "lavado", en donde se lleva a cabo la disolución de los componentes solubles sobre las superficies de la matriz. Si bien estos mismos autores mencionan que existe una segunda etapa conocida como extracción lenta (hasta 60 min), debe considerarse que durante el proceso se busca minimizar el tiempo de extracción y costo del proceso¹⁵⁶. Estas apreciaciones fueron tomadas en cuenta a la hora de elegir un método extractivo. Además, diversos autores destacan los beneficios de las temperaturas moderadas (aproximadamente 60 °C – 70 °C) para una extracción óptima.

Consecuentemente, estos resultados coinciden con los resultados del análisis de la capacidad antioxidante para los mismos ensayos y condiciones de extracción. Por lo tanto, nuestros resultados y los encontrados en bibliografía mencionada anteriormente, indican que el uso del ultrasonido es una técnica que refuerza los procesos de extracción y resultaría conveniente estudiar exhaustivamente las condiciones de potencia y temperatura con el fin de que se justifique el uso del mismo. Con el fin de conocer debidamente la relación que existe en nuestros sistemas entre capacidad antioxidante medida por ABTS, cantidad de compuestos fenólicos mediante Folin-Ciocalteu, y las variables ensayadas, resultaría conveniente tomar condiciones más drásticas en los métodos de extracción, como ser: mayor tiempo y mayores potencias.

4.2.2.1. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN EL ORÉGANO

Se realizó la caracterización de los compuestos fenólicos en el orégano mediante el uso de HPLC según las condiciones descritas en el punto 3.2.2.3, en la Figura 15 se muestra el cromatograma de la solución de orégano.

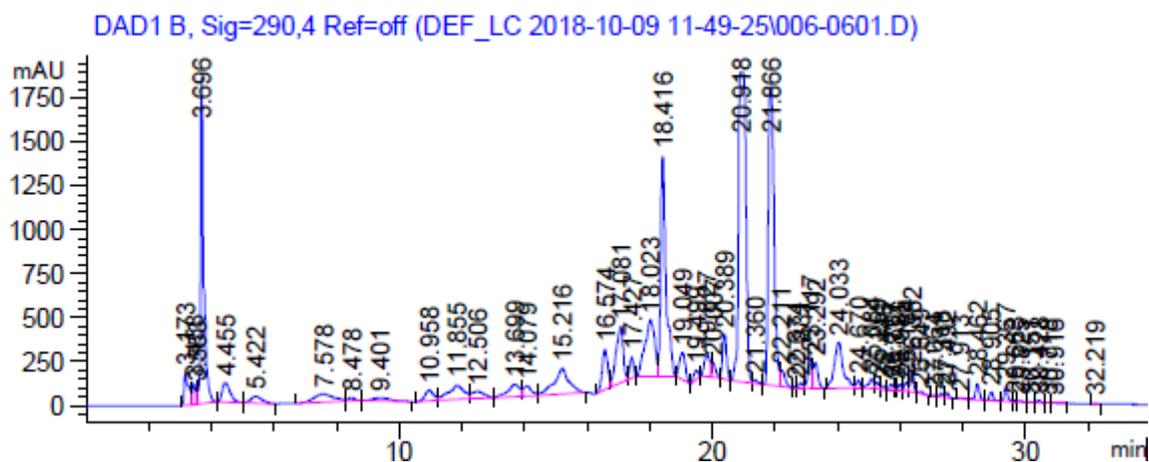


Figura 15: Cromatograma de la solución de orégano a 290,4 nm.

En la solución se identificaron tres compuestos en mayor proporción de acuerdo a los patrones utilizados (Ver: Anexo): ácido clorogénico (tr: 13,69), ácido gálico (tr: 5,42) y ácido caféico (tr: 12,50) (Figura 16). Asimismo, en bibliografía consultada^{157 142 143 144 141} se identificaron los ácidos clorogénico y gálico como los principales compuestos fenólicos en extractos de orégano. A pesar de que estos autores encontraron en promedio valores de ácido gálico y clorogénico (1,19 mg de compuesto/g de orégano, 2,10 mg de compuesto/g de orégano respectivamente) superiores a los hallados en este trabajo experimental, ciertamente dichos compuestos se hallaron en mayor cantidad que el resto de los componentes analizados en las muestras. Rutina y quercetina fueron los compuestos encontrados en menor proporción, lo que concuerda con los resultados proporcionados por autores que han analizado el orégano^{158 159}, donde para quercetina encuentran un valor de 0,045; muy similar al valor encontrado en este trabajo. Como complemento a estos resultados, es pertinente aclarar que diversos autores mencionan al ácido rosmarínico como el principal compuesto identificado en extractos de *Origanum vulgare*, pero en cantidades variables que van desde los 12,83 a 23,53 mg de compuesto/g de orégano^{159 160}.

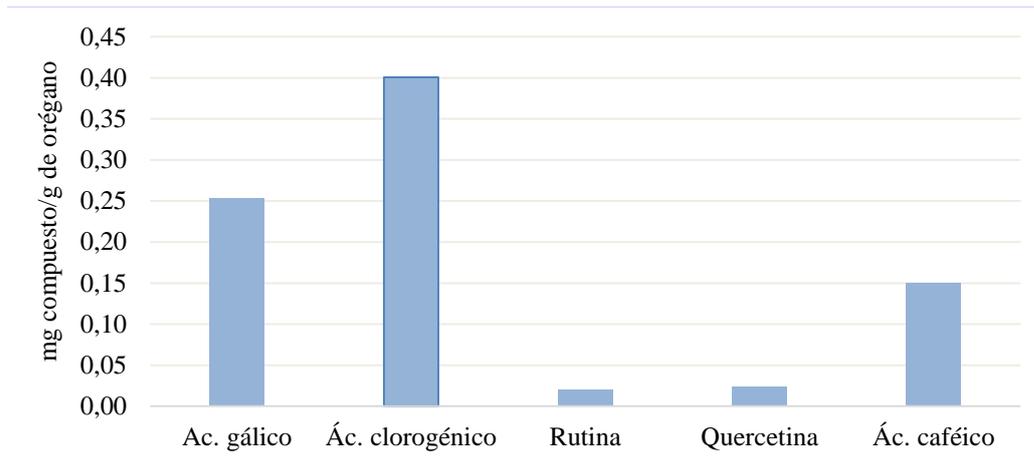


Figura 16: Identificación de compuestos fenólicos presentes en la solución de orégano.

Fue muy difícil lograr una comparación más detallada con otras publicaciones científicas, ya que los autores usaron diferentes métodos de extracción, otros protocolos experimentales y materiales de plantas de diferentes áreas geográficas.

Los resultados aquí descriptos pueden ser útiles para obtener extractos con una buena caracterización química, importante para experimentos adicionales o ensayos clínicos, o para extender el potencial terapéutico de esta especie.

4.2.3. RELACIÓN ENTRE EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES Y LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

En la Figura 17 se graficaron los valores encontrados para el contenido de fenoles totales (obtenidos mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu) y la capacidad antioxidante (determinada mediante la técnica de ABTS) para todos los ensayos descriptos en la Tabla 2, con el propósito de deducir si existió una correlación entre ellos.

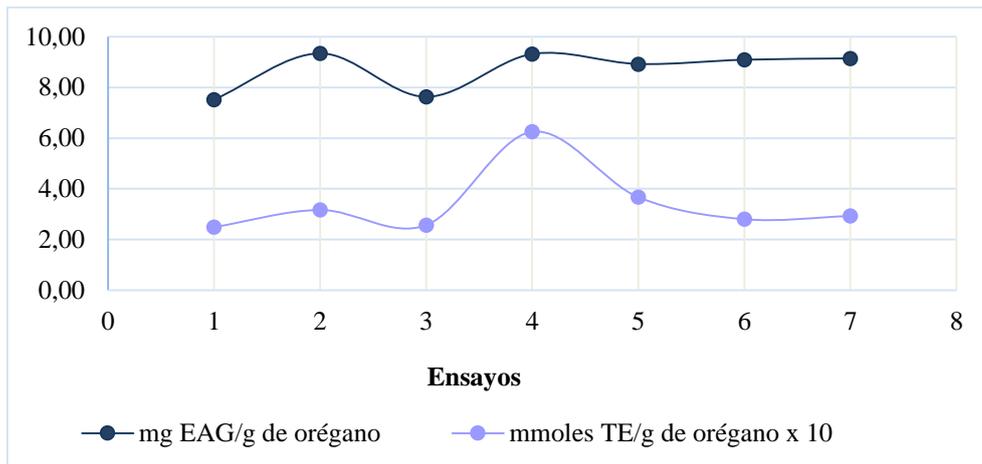


Figura 17: Relación entre el contenido de compuestos fenólicos totales y la determinación de la capacidad antioxidante. Los compuestos fenólicos se expresan como mg EAG/g y la capacidad antioxidante se expresa como mmoles de TE/g de orégano. Estos últimos, se multiplicaron por 10 con el fin de que la comparativa sea gráficamente más visible.

La tendencia en los valores obtenidos indicó una correlación entre el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante de nuestras muestras. Ambos análisis dejan en evidencia que los valores de los ensayos 1 y 3 fueron menores con respecto al resto. Este resultado nos permitió inferir que los polifenoles totales presentes en el orégano contribuyeron a la capacidad antioxidante del mismo. Dicho comportamiento concuerda con los hallazgos de Lim et al¹⁶¹, donde menciona en una de sus publicaciones la existencia de una correlación positiva entre la actividad antioxidante de extractos de hongos comestibles-medicinales con el contenido de compuestos fenólicos. A su vez, coincide con los estudios de otros investigadores^{162 163}.

Sin embargo, se sabe que la capacidad antioxidante no solo depende del contenido de polifenoles sino de otros factores no considerados en este trabajo. Por lo que sería conveniente realizar estudios de identificación de estos otros posibles compuestos presentes en el orégano.

4.3. DESARROLLO DE UN ALIMENTO FUNCIONAL UTILIZANDO ORÉGANO COMO FUENTE DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

4.3.1. ESCALDADO

Se realizó la primera prueba del paté de hongos según la receta descrita en el punto 3.3.2. Dado que el pH medido fue de 6,28, se realizó un escaldado con ácido cítrico al 0,5 % con el fin de disminuir el valor de pH, ya que se buscaba un valor menor a 4,3 aproximadamente, que según bibliografía es el valor óptimo para que el paté sea comestible y se mantenga en condiciones adecuadas a lo largo de su vida útil^{115 133}.

La estructura sumamente porosa del hongo y el corte empleado, permitió que el ácido cítrico penetrara rápidamente. Fue fundamental reducir el tiempo de escaldado al mínimo posible ya que además de la pérdida de componentes, se producen cambios bioquímicos que conllevan en general a efectos de deterioro sobre las propiedades sensoriales tales como el aroma, color y textura.

Fue necesario obtener condiciones ideales de escaldado para mantener el encogimiento y la pérdida de peso del hongo bajo control y en valores mínimos, además de anular la actividad enzimática, principalmente la inactivación de la enzima peroxidasa. Por esto, se mantuvieron temperaturas superiores a 70 °C por tiempos mayores a 150 segundos durante el proceso. Luego de realizado éste; el producto elaborado se consideró más seguro para el consumo humano¹¹⁵.

Cabe mencionar que durante el escaldado del hongo, se probaron tres ácidos orgánicos diferentes como solución: ácido cítrico, ácido láctico y ácido acético. Se descartó el ácido acético mediante la realización de pruebas sensoriales preliminares. El ácido cítrico y ácido láctico fueron posibles candidatos a utilizarse en el escaldado, pero se escogió el ácido cítrico debido a que éste produjo un pH más ácido y en un valor estable por debajo de 4,6 (deseable para que el alimento sea considerado seguro para la salud humana). Del mismo modo, la bibliografía consultada describe que el ácido cítrico disminuye el pH en mayor medida que el ácido láctico en igualdad de condiciones analíticas¹¹⁵.

4.3.2. PATÉ DE HONGOS

Durante el proceso de elaboración de los patés, se constató que éstos presentaban un aspecto característico propio de cualquier paté, siendo de textura suave, untable y de color similar al mencionado en bibliografía¹¹⁵ (Figura 18).



Figura 18: Fotografía tomada en el laboratorio, luego de elaborados y envasados los patés.

Resulta interesante que la solución de ácido cítrico una vez agregado el orégano, tomó un color verde intenso, el cual no estuvo presente en el producto final, es decir, el paté. Este comportamiento se destaca positivamente en caso de que la técnica sea utilizada a un nivel industrial con fines comerciales en el futuro, ya que el paté elaborado con orégano como materia prima no presenta un color que podría ser considerado indeseable por los consumidores.

4.3.3. ESTUDIO DEL EFECTO DEL HONGO FRENTE A LOS ANTIOXIDANTES PROVENIENTES DEL ORÉGANO

Con el fin de estudiar el efecto del hongo frente a los antioxidantes contenidos en la solución del extracto de orégano, se realizó el estudio de la determinación de la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos a las alícuotas de la solución de ácido cítrico antes y después de agregar el hongo al proceso de elaboración de los patés según punto 3.3.3. A priori se espera que el agregado de hongos disminuya la cantidad de los compuestos estudiados en la solución de ácido cítrico resultante, ya que se especula que los mismos sean absorbidos por el hongo durante la instancia de escaldado.

En primer lugar se realizó el ensayo de Folin-Ciocalteu, el cual cuantifica compuestos fenólicos totales (Tabla 8).

Tabla 8: Compuestos fenólicos totales presentes en la solución de ácido cítrico.

Muestra	mg EAG/g
1	185,52 ± 9,38 ^a
1'	99,63 ± 5,58 ^b

Nota: Los compuestos fenólicos se expresan como mg de equivalentes de ác gálico/g liofilizado (mg EAG/ g) tomando en cuenta el promedio ± desviación estándar. Las letras en una misma columna representan diferencias significativas entre las medidas de compuestos fenólicos por el test de Tukey con una significancia (p<0,05).

Claramente se observa que el valor obtenido de polifenoles totales de la muestra 1' fue menor al obtenido para la muestra 1. Esto indica que el ácido cítrico luego de colar los hongos (muestra 1') contuvo menor cantidad de compuestos fenólicos totales con respecto al ácido cítrico resultante luego de colar el orégano en un paso anterior en la elaboración del paté (muestra 1). Por lo tanto, se especula que el hongo absorbe compuestos fenólicos de la solución de ácido cítrico, dando lugar a una disminución de los mismos en la solución. Este fenómeno es explicado mediante un proceso de osmosis, del cual el hongo obtiene a partir de la solución los compuestos polifenólicos y por lo tanto la misma es carente en éstos.

Posteriormente se realizó la determinación de la actividad antioxidante que presentaban las mismas muestras utilizando la técnica ABTS según se describe en el punto 3.3.5. (Tabla 9).

Tabla 9: Compuestos antioxidantes presentes en la solución de ácido cítrico.

Muestra	IC50
1	0,85 ± 0,04 ^a
1'	1,17 ± 0,04 ^b

Nota: Los valores de compuestos antioxidantes se expresan como valores promedio ± desviación estándar de IC50. Las letras diferentes en una misma columna representan diferencias significativas entre las medidas por el test de Tukey con una significancia (p<0,05).

Como se aprecia en la Tabla 9, los valores de IC50 de la muestra 1' fueron mayores en relación con los de la muestra 1. Al ser necesarios más cantidad de compuestos antioxidantes para atrapar el 50 % de los radicales ABTS (IC50), la muestra 1' contenía una menor capacidad antioxidante respecto a la muestra 1, por lo que se deduce que los compuestos antioxidantes presentes en la solución de ácido cítrico resultante disminuyeron una vez que se agregaron los hongos al proceso de elaboración del paté.

Sin lugar a dudas, los dos ensayos mencionados en este punto fueron coherentes entre si y apuntaron a afirmar que el hongo es una buena matriz alimenticia para incorporar los compuestos antioxidantes presentes en el ácido cítrico provenientes del orégano.

4.3.4. CARACTERIZACIÓN Y ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DEL PATÉ

Se estudió la estabilidad del pate en el transcurso de 60 días. Para dicho fin se midió el color, el pH y se determinó la actividad antioxidante y cantidad de compuestos fenólicos totales de cada paté. Las medidas de dichos parámetros se realizaron en el día 1, día 30 y día 60 como se explicó anteriormente en la sección materiales y métodos.

4.3.4.1. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DEL COLOR

Se evaluó para cada paté los parámetros de espacio de color: L*, luminosidad; a*, intensidad de color rojo (+) o verde (-) y b*, de la intensidad de color amarillo (+) o azul (-); c*, saturación (comenzando en 0 en el eje de luminosidad); y H*, matiz (el ángulo de matiz comienza en el eje (+) a* y se expresa en grados) (Tabla 10).

Se cumplió con un cronograma estricto en donde se evaluaron cada uno de los tres patés.

Tabla 10: Parámetros de espacio del color para el paté.

Parámetro	L	A	B	c	H
Día 1	58,31 ± 0,34 ^a	3,87 ± 0,01 ^b	16,19 ± 0,13 ^c	16,61 ± 0,12 ^d	76,53 ± 0,07 ^e
Día 30	56,97 ± 0,44 ^a	4,37 ± 0,21 ^b	16,78 ± 0,31 ^c	17,34 ± 0,36 ^d	75,43 ± 0,42 ^e
Día 60	55,96 ± 0,15 ^a	4,53 ± 0,25 ^b	17,11 ± 0,47 ^c	17,69 ± 0,53 ^d	75,19 ± 0,41 ^e

Nota: Los valores se expresan como promedio ± desviación estándar cada parámetro. Las letras iguales en una misma columna representan que no existen diferencias significativas entre los parámetros del color por el test de Tukey con una significancia (p<0,05).

Como resultado de estas medidas, se observó que los parámetros se mantuvieron constantes (Figura 19) a lo largo del tiempo (60 días). Consiguientemente, quedó demostrado que no se produjo un cambio de color en las condiciones de esterilización y almacenamiento de los patés estudiados.

Los valores más altos fueron los correspondientes al parámetro H: matiz, en el entorno de los 75° y el parámetro L: luminosidad, en un promedio de 57.

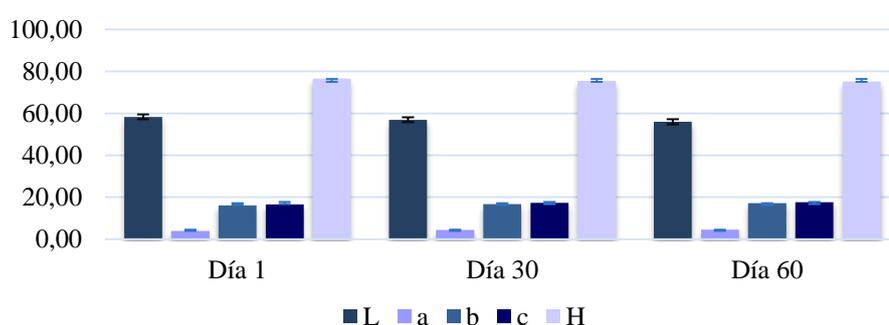


Figura 19: Representación gráfica de la estabilidad de los parámetros de color a lo largo del tiempo. Para cada uno de ellos se graficó el promedio \pm desviación estándar.

4.3.4.2. MEDIDAS DE pH

Se realizaron las medidas de pH a los paté del día 1, día 30 y día 60 luego de elaborados los mismos (Tabla 11).

Tabla 11: Medidas de pH de los patés

Día	pH
1	4,30 \pm 0,000 ^a
30	4,26 \pm 0,006 ^a
60	4,26 \pm 0,006 ^a

Nota: los resultados se expresan como el promedio \pm desviación estándar. Las letras iguales representan que no existen diferencias significativas entre las medidas de pH por el test de Tukey ($p < 0,05$).

Según los resultados que arroja la Tabla 11, los pH medidos se mantuvieron constantes a lo largo del tiempo y no existieron diferencias significativas entre sus medidas. Por lo tanto, el

pH del paté envasado sin abrir, es decir en condiciones de esterilización, no varió en un plazo de 2 meses a partir de su fecha de elaboración.

En promedio, el pH fue de $4,28 \pm 0,01$, valor acorde al esperado luego de realizar el proceso de escaldado. A partir de estos hallazgos se concluyó que el escaldado se realizó correctamente, derivando en un paté con un valor de pH adecuado para mantener las condiciones que favorezcan la estabilidad de un producto inocuo. A su vez, mantener el pH en un valor menor a 4,6 evita el crecimiento de una bacteria anaeróbica estricta denominada *Clostridium botulinum*, formadora de esporas que producen neurotoxinas¹⁶⁴. Esta característica es buscada en la industria alimentaria, ya que dicha bacteria juega un papel perjudicial al ser la spora termo resistente y sobrevive a periodos de calor intenso incluso durante varias horas de esterilización.

4.3.4.3. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Según la técnica descrita en el punto 3.3.6.3., se determinó la capacidad antioxidante en todos los patés analizados (Tabla 12).

Tabla 12: Determinación de capacidad antioxidante en el paté.

µmoles Trolox/g de paté		
Día 1	Día 30	Día 60
$1,63 \pm 0,04^a$	$1,64 \pm 0,10^a$	$1,76 \pm 0,01^a$

Nota: La capacidad antioxidante se expresa como valores promedio \pm desviación estándar de todas las medidas realizadas y como µmoles de TE/g de paté. Las letras iguales en una misma fila representa que no existen diferencias significativas entre las medidas ABTS por el test de Tukey con una significancia ($p < 0,05$).

En cuanto a los resultados del ensayo de ABTS, se visualiza según la Tabla 12 que los valores de µmoles Trolox/g de paté se mantuvieron constantes durante los 60 días, sin existir una significancia estadística. Por esta razón, se concluye que la capacidad antioxidante permaneció constante en el tiempo estudiado para todos los tipos de patés analizados.

4.3.4.4. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES

Tal como se describe en el punto 3.3.6.3., se utilizó la técnica de Folin-Ciocalteu para analizar el contenido de compuestos fenólicos totales en los patés y realizar un seguimiento de los mismos durante los días 1, 30 y 60 de elaborados (Tabla 13).

Tabla 13: Compuestos fenólicos totales presentes en los patés.

mg EAG/g		
Día 1	Día 30	Día 60
245,73 ± 9,39 ^a	283,42 ± 6,57 ^a	297,71 ± 2,90 ^a

Nota: Los compuestos fenólicos se expresan como mg de equivalentes de ác. Gálico/g de paté. Se tuvieron en cuenta los promedios ± desviación estándar de todas las medias. Las letras iguales en una misma fila representan que no existen diferencias significativas entre las medidas de compuestos fenólicos por el test de Tukey ($p < 0,05$).

En la Tabla 13 se observa que hubo un pequeño aumento en la cantidad de compuestos fenólicos totales con el paso del tiempo. Sin embargo, el resultado arrojado por el test estadístico indicó que no hubo diferencias significativas entre los valores de compuestos fenólicos totales. Por lo tanto, queda demostrado que la cantidad de compuestos fenólicos fue constante en un período de almacenamiento de 2 meses a partir de que fueron elaborados los patés y bajo un proceso de esterilización exitoso.

4.3.4.4.1. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN EL PATÉ DE HONGO

Tal como se expone en el punto 3.3.6.3.1, se identificaron los principales compuestos fenólicos presentes en el paté de hongo de acuerdo a los patrones utilizados (Figura 20).

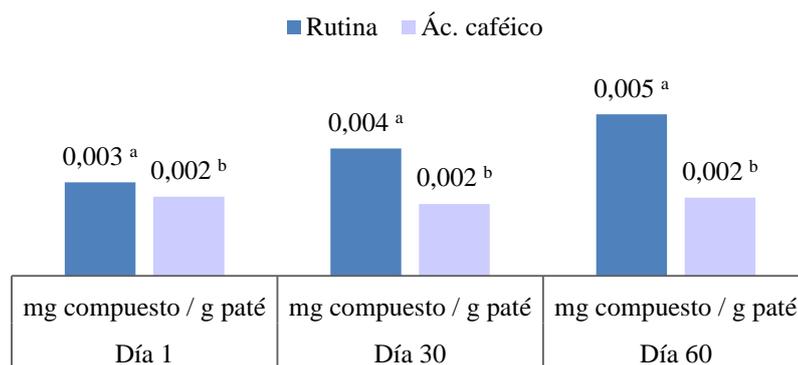


Figura 20: Identificación de compuestos fenólicos presentes en el paté de hongos. Los valores se expresan como mg de compuesto/g de paté. Las letras iguales en cada compuesto significa que no existen diferencias significativas entre las medidas por el test de Tukey ($p < 0,05$).

Según los resultados arrojados por la tabla, los patés revelaron la presencia de rutina (flavonoide) y ácido caféico (ácido hidroxicinámico) en cada uno de los tiempos analizados dentro del estudio de su estabilidad, con concentraciones promedio de 0,004 y 0,002 mg/g respectivamente. Los compuestos fenólicos mencionados anteriormente confirmaron que no existió un declive en la concentración de los mismos a lo largo del tiempo, considerando que las variaciones en los valores se encontraron dentro de las propias del método analítico y no resultaron significativas estadísticamente.

Según bibliografía consultada, el hongo *Pleurotus ostreatus* posee los siguientes compuestos antioxidantes pertenecientes al grupo de los ácidos fenólicos: ácido caféico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido protocatecuico y ácido gálico. Mencionan además a los flavonoides rutina y quercetina^{165 166 167 168}, por lo que los hallazgos en este trabajo experimental respecto a la identificación de compuestos fenólicos coinciden con los informados por otros autores. Es oportuno aclarar que en este análisis no fue posible discernir el origen de los compuestos fenólicos en la preparación final del paté, no obstante es relevante el hallazgo de que la concentración se mantuvo constante a lo largo del período estudiado.

5. CONCLUSIÓN

Como resultado de este trabajo experimental, se obtuvieron las siguientes conclusiones:

1. Se determinó la composición química, del orégano para conocer el material de partida para este trabajo. Los resultados obtenidos fueron concordantes con bibliografía.
2. En cuanto a las técnicas extractivas, los resultados indicaron que no hubo diferencias significativas para la determinación de la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos entre los distintos ensayos. Por lo tanto, el empleo del ultrasonido como herramienta extractiva no fue eficaz en este trabajo experimental. Sin embargo, se estableció un aumento significativo en las determinaciones realizadas para aquellos ensayos que fueron sometidos a un proceso de extracción más extenso.
3. Se identificaron rutina y ácido caféico como los principales compuestos antioxidantes presentes en el orégano de acuerdo a los patrones utilizados. Los valores coinciden con los mencionados por otros autores académicos.
4. Se demostró que el agregado de *Origanum vulgare* al paté de hongos aumentó el contenido de polifenoles y compuestos antioxidantes del mismo. Por lo tanto, la incorporación de extractos bioactivos del orégano en el desarrollo de un paté de hongos fue una excelente estrategia para aportar valor agregado al mismo (alimento funcional).
5. El seguimiento de la estabilidad mediante medidas de pH, color, contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en el paté demostraron que el mismo permaneció estable en un plazo de 60 días a partir de su elaboración. Por lo tanto, las condiciones de escaldado, el ajuste del pH con ácido cítrico y la incorporación de orégano, resultaron estrategias exitosas que permitieron extender la vida útil del paté.

6. REFERENCIAS

1. Huang D, Boxin OU, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem.* 2005;53(6):1841-1856. doi:10.1021/jf030723c
2. Maritim AC, Sanders RA WJ. Diabetes, oxidative stress and antioxidants: a review. *Biochem Mol Toxicol.* 2003;17:24-38.
3. Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JPE, Tognolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal.* 2013;18(14):1818-1892. doi:10.1089/ars.2012.4581
4. Nikousaleh A PJ. Antioxidant components and properties of dry heat treated clove in different extraction solvents. *J Food Sci Technol.* 2016;53:1993-2000.
5. Costa P, Gonçalves S, Valentão P, Andrade PB RA. Accumulation of phenolic compounds in in vitro cultures and wild plants of *Lavandula viridis* L'Hér and their antioxidant and anticholinesterase potential. *Food Chem Toxicol.* 2013;57:69-74.
6. Villela PTM, Villela PTM, Ferriolli E, et al. Salt preference in hypertensive and normotensive, older and younger individuals. *J Am Soc Hypertens.* 2014;8(4):117-118.
7. Lee HP, Zhu X, Casadesus G, Castellani RJ, Nunomura A, Smith MA, Lee H PG. Antioxidant approaches for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother.* 2010;10:1201-1208.
8. Fernandes RPP, Trindade MA, Tonin FG, Lima CG, Pugine SMP, Munekata PES, Lorenzo JM de MM. Evaluation of antioxidant capacity of 13 plant extracts by three different methods: cluster analyses applied for selection of the natural extracts with higher antioxidant capacity to replace synthetic antioxidant in lamb burgers. *J Food Sci Technol.* 2016;53:451-460.
9. Valencia del Toro G, Garín Aguilar ME, Cuadros Moreno A, Aguilar Doroteo L DPE. Actividad antibacteriana de extractos de cepas híbridas y parentales de *Pleurotus* spp. *Hongos Comest y Med en Iberoamérica.* 2012;(1º Ed.).
10. Rodríguez J., Menéndez Y. TM. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Cuba Med Milit.* 2001;30 (1), 15-20.
11. Pastene ER. Estado actual de la búsqueda de plantas con actividad antioxidante. *Bol Latinoam y del Caribe Plantas Med y Aromat.* 2009;8(6):449-455. doi:10.1016/j.eurpolymj.2015.01.036

12. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999;26(9-10):1231-1237. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10381194>. Accessed September 16, 2018.
13. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 1999;299:152-178. doi:10.1016/S0076-6879(99)99017-1
14. Dipplock, A.; Agget, P.; Ashwell, M.; Bornet, F.; Fern, E.; Robertfroid M. Scientific Concepts of Functional Foods in Europe - Consensus Document. *Br J Nutr.* 1999;81(1):1-27. doi:10.1017/S0007114599000471
15. Halliwell B. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med.* 1995;18(I):125-126.
16. Shahidi F, Zhong Y. Revisiting the Polar Paradox Theory: A Critical Overview. *J Agric Food Chem.* 2011;59(8):3499-3504. doi:10.1021/jf104750m
17. Ibáñez FC, Torre P, Irigoyen A. Aditivos alimentarios. *Área Nutr y Bromatol - Univ Pública Navarra.* 2003:10.
18. Yan F, Azizi A, Janke S, Schwarz M, Zeller S, Honermeier B. Antioxidant capacity variation in the oregano (*Origanum vulgare* L.) collection of the German National Genebank. *Ind Crops Prod.* 2016;92:19-25. doi:10.1016/j.indcrop.2016.07.038
19. Kohen R, Nyska A. Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicol Pathol.* 2002;30(6):620-650. doi:10.1080/0192623029016672
20. Kohen R, Chevion S, Scharz R BE. Evaluation of the total low molecular weight antioxidant activity of plasma in health and diseases: a new approach. *Cell Pharmacol.* 1996;3:335-59.
21. Dro W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev.* 2002:47-95. doi:10.1152/physrev.00018.2001
22. Halliwell B. Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. *eLS.* 2015:1-9. doi:10.1002/9780470015902.a0002269.pub3
23. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001
24. Katharine Briegera, Stefania Schiavonea, Francis J. Miller Jr.b K-HK. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly.* 2012;142(13659).

25. Rivera Chávez FH. Propiedades antioxidantes de extractos metanólicos de fruto de fresa de variedades mexicanas y extranjeras. October 2013. <https://tesis.ipn.mx/handle/123456789/12249>. Accessed August 26, 2018.
26. Bustos P. *Modulación de La Actividad de Enzimas Antioxidantes Por Metabolitos Secundarios de Plantas.*; 2018.
27. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(17):7915-7922. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8367443>. Accessed November 26, 2018.
28. Forman HJ, Torres M. Redox signaling in macrophages. *Mol Aspects Med.* 22(4-5):189-216. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11679166>. Accessed November 26, 2018.
29. Kasai, H., Y. Okada, S. Nishimura, M SR and JKR. Formation of 8 hydroxydeoxyguanosine in liver DNA of rats following long-term exposure to a peroxisome proliferator. *Cancer Res.* 1989;49:2603-2605.
30. Zangar R, Davydov DR, Verma S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004;199(3):316-331. doi:10.1016/j.taap.2004.01.018
31. Pico DFÁ, Villacres JRC. Aplicación del método químico DPPH para determinar la capacidad antioxidante presente en una mermelada de tuna. 2010.
32. Pandey KB, Rizvi SI. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. *Oxid Med Cell Longev.* 2010;3(1):2-12. doi:10.4161/oxim.3.1.10476
33. KJ D. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. 1995;61:1-31. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8660387>.
34. de la Torre K. Efecto del consumo de aceite de oliva sobre la composición de las lipoproteínas de baja densidad en individuos de diferentes países europeos. 2007.
35. Yu L, Perret J, Davy B, Wilson J, Melby CL. Antioxidant Properties of Cereal Products. *J Food Sci.* 2002;67(7):2600-2603. doi:10.1111/j.1365-2621.2002.tb08784.x
36. Rosser BG, Gores GJ. Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications. *Gastroenterology.* 1995;108(1):252-275. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7806049>. Accessed September 16, 2018.
37. Valenzuela V C, Pérez M P. Actualización en el uso de antioxidantes naturales derivados de frutas y verduras para prolongar la vida útil de la carne y productos

- cárneos. *Rev Chil Nutr.* 2016;43(2):12-12. doi:10.4067/S0717-75182016000200012
38. Ajila CM, Naidu KA, Bhat SG, Prasada Rao UJS. Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. 2007. <http://ir.cftri.com/6430/>. Accessed September 16, 2018.
 39. González-Montelongo R, Lobo MG, González M. The effect of extraction temperature, time and number of steps on the antioxidant capacity of methanolic banana peel extracts. *Sep Purif Technol.* 2010;71(3):347-355. doi:10.1016/J.SEPPUR.2009.12.022
 40. Ruete CM de los S. Impacto del uso de antioxidantes naturales sobre la estabilidad del color y de los lípidos de hamburguesas de cordero. 2018.
 41. MSP. *Reglamento Bromatológico Nacional.*; 1994:354.
 42. Barea Álvarez M. *Caracterización, Capacidad Antioxidante y Perfil Fenólico de Frutas Subtropicales Producidas y Comercializadas En La Costa de Granada-Málaga.*; 2015. <https://hera.ugr.es/tesisugr/26116698.pdf>.
 43. Jauam GJ. Tesis de licenciatura“ Antioxidantes Naturales ” Consumo de Antioxidantes Naturales. 2011:1-142.
 44. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004;79(5):727-747. doi:10.1093/ajcn/79.5.727
 45. Juárez MMC. Efecto de los antioxidantes del té verde (extracto de polifenoles [P60], catequinas y kaemferol) sobre la inducción de micronúcleos y de apoptosis en ratones tratados con Cr (VI). *Fac Estud Super Zaragoza.* 2014.
 46. Robbins RJ. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. 2003. doi:10.1021/JF026182T
 47. Vinson JA, Jang J, Dabbagh YA, Serry MM, Cai S. Plant Polyphenols Exhibit Lipoprotein-Bound Antioxidant Activity Using an in Vitro Oxidation Model for Heart Disease. *J Agric Food Chem.* 1995;43(11):2798-2799. doi:10.1021/jf00059a004
 48. Lin J-K, Weng M-S. Flavonoids as Nutraceuticals. In: *The Science of Flavonoids.* New York, NY: Springer New York; 2006:213-238. doi:10.1007/978-0-387-28822-2_8
 49. Muller KE. Capacidad antioxidante y contenido de flavonoides entre las semillas de chia negra y chia blanca. 2015:73.
 50. Soriano del Castillo JM. *Nutrición Básica Humana.* <https://www.casadellibro.com/libro-nutricion-basica-humana/9788437065465/1113377>. Accessed September 16, 2018.

51. Rice-Evans C, Burdon RH. *Free Radical Damage and Its Control*. Elsevier; 1994.
52. CORFO-Chile. Antioxidantes: Definición, clasificación y conceptos generales. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA).
53. Duthie, G.G., Gardner, P.T., and Kyle JAM. Plant Polyphenols: Are they the new magic bullet? *Proc Nutr Soc*. 2003;62(3):599-603.
54. Ahmed OANPS and AKP. Antioxidant capacity of crude water and ethyl acetate extracts of some Indian spices and their antimicrobial activity against *Vibrio vulnificus* and *Micrococcus luteus*. *J Med Plants Res*. 2013;7(26):1907-1915.
55. Ugalde V. Estudio del sistema ABTS/LACASA para su aplicación en la evaluación de la capacidad antioxidante de alimentos. 2008.
56. Khokhar S, Owusu Apenten RK. Iron binding characteristics of phenolic compounds: some tentative structure–activity relations. *Food Chem*. 2003;81(1):133-140. doi:10.1016/S0308-8146(02)00394-1
57. Williamson G, Plumb GW, Garcia-Conesa MT. Glycosylation, Esterification, and Polymerization of Flavonoids and Hydroxycinnamates: Effects on Antioxidant Properties. In: *Plant Polyphenols 2*. Boston, MA: Springer US; 1999:483-494. doi:10.1007/978-1-4615-4139-4_26
58. Gorinstein S, Haruenkit R, Poovarodom S, et al. Some analytical assays for the determination of bioactivity of exotic fruits. *Phytochem Anal*. 2010;21(4):355-362. doi:10.1002/pca.1207
59. Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Res Int*. 2006;39(7):791-800. doi:10.1016/J.FOODRES.2006.02.003
60. Acon Chan Y. Evaluación del efecto antioxidante y antimicrobiano del orégano (*Origanum vulgare*) en polvo y en oleoresina y de la mostaza china (*Brassica rapa* var. *pekinensis*) en polvo, como alternativa natural en productos cárnicos. 2016.
61. Kintzios SE. Oregano. *Handb Herbs Spices Second Ed*. 2012;2:417-436. doi:10.1533/9780857095688.417
62. Grieve M (Maud), Leyel CF, Marshall M. *A Modern Herbal: The Medicinal, Culinary, Cosmetic and Economic Properties, Cultivation and Folk-Lore of Herbs, Grasses, Fungi, Shrubs & Trees with All Their Modern Scientific Uses*. Dover Publications; 1982.
63. Makri O. Cultivation of Oregano. August 2003:167-176. doi:10.1201/B12591-14
64. Solís Campoverde PN. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de los Aceites

- Esenciales de Orégano (*Origanum vulgare* L.) y Tomillo (*Thymus vulgaris* L.) como Potenciales Bioconservadores en Carne de Pollo.. 2012. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/1992>. Accessed September 16, 2018.
65. Banco Central de Reservas del Perú. *Informe Económico y Social - Región Tacna.*; 2013:12.
 66. Kokkini S, Karousou R, Hanlidou E. HERBS | Herbs of the Labiatae. *Encycl Food Sci Nutr*. January 2003:3082-3090. doi:10.1016/B0-12-227055-X/00593-9
 67. Kintzios SE. *Oregano : The Genera Origanum and Lippia*. Taylor and Francis; 2002.
 68. Chagua EAT. Comercialización de orégano orgánico como especialidad en la región Tacna - Perú. 2010.
 69. Da Mastro G, Fracchiolla M, Verdini L, Montemurro P. Oregano and its potential use as bioherbicide. *Acta Hortic*. 2006;(723):335-346. doi:10.17660/ActaHortic.2006.723.46
 70. Allan P, Bilkei G. Oregano improves reproductive performance of sows. *Theriogenology*. 2005;63(3):716-721. doi:10.1016/j.theriogenology.2003.06.010
 71. Bimczok D, Rau H, Sewekow E, Janczyk P, Souffrant WB, Rothkötter H-J. Influence of carvacrol on proliferation and survival of porcine lymphocytes and intestinal epithelial cells in vitro. *Toxicol Vitro*. 2008;22(3):652-658. doi:10.1016/j.tiv.2007.11.023
 72. Dragland S, Senoo H, Wake K, Holte K, Blomhoff R. Several Culinary and Medicinal Herbs Are Important Sources of Dietary Antioxidants. *J Nutr*. 2003;133(5):1286-1290. doi:10.1093/jn/133.5.1286
 73. Cynthia Cristina Arcila-Lozano, Guadalupe Loarca-Piña, Salvador Lecona-Urbe EG de M. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Arch Latinoam Nutr*. 2004;54(1):100-111.
 74. Gutiérrez-Grijalva EP, Picos-Salas MA, Leyva-López N, Criollo-Mendoza MS, Vazquez-Olivo G, Basilio Heredia J. Flavonoids and Phenolic Acids from Oregano: Occurrence, Biological Activity and Health Benefits. 2017. doi:10.3390/plants7010002
 75. Zheng W, Wang SY. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J Agric Food Chem*. 2001;49(11):5165-5170. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11714298>. Accessed September 16, 2018.
 76. Almela L, Sánchez-Muñoz B, Fernández-López JA, Roca MJ, Rabe V. Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging

- activity of rosemary extract from different raw material. *J Chromatogr A*. 2006;1120(1-2):221-229. doi:10.1016/j.chroma.2006.02.056
77. del Baño MJ, Lorente J, Castillo J, et al. Phenolic Diterpenes, Flavones, and Rosmarinic Acid Distribution during the Development of Leaves, Flowers, Stems, and Roots of *Rosmarinus officinalis* . Antioxidant Activity. *J Agric Food Chem*. 2003;51(15):4247-4253. doi:10.1021/jf0300745
 78. Moraes-de-Souza RA, Oldoni TLC, Regitano-D'Arce MAB, Alencar SM. Antioxidant activity and phenolic composition of herbal infusions consumed in Brazil. *Cienc y Tecnol Aliment*. 2008;6(1):41-47. doi:10.1080/11358120809487626
 79. Shan B, Cai YZ, Sun M, Corke H. Antioxidant Capacity of 26 Spice Extracts and Characterization of Their Phenolic Constituents. *J Agric Food Chem*. 2005;53(20):7749-7759. doi:10.1021/jf051513y
 80. Gonçalves S, Moreira E, Grosso C, Andrade PB, Valentão P, Romano A. Phenolic profile, antioxidant activity and enzyme inhibitory activities of extracts from aromatic plants used in Mediterranean diet. *J Food Sci Technol*. 2017;54(1):219-227. doi:10.1007/s13197-016-2453-z
 81. Rodriguez-Garcia I, Silva-Espinoza BA, Ortega-Ramirez LA, et al. Oregano Essential Oil as an Antimicrobial and Antioxidant Additive in Food Products. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2016;56(10):1717-1727. doi:10.1080/10408398.2013.800832
 82. Bower AM, Real Hernandez LM, Berhow MA, de Mejia EG. Bioactive Compounds from Culinary Herbs Inhibit a Molecular Target for Type 2 Diabetes Management, Dipeptidyl Peptidase IV. *J Agric Food Chem*. 2014;62(26):6147-6158. doi:10.1021/jf500639f
 83. Berdowska I, Zieliński B, Fecka I, Kulbacka J, Saczko J, Gamian A. Cytotoxic impact of phenolics from Lamiaceae species on human breast cancer cells. *Food Chem*. 2013;141(2):1313-1321. doi:10.1016/j.foodchem.2013.03.090
 84. Koldaş S, Demirtas I, Ozen T, Demirci MA, Behçet L. Phytochemical screening, anticancer and antioxidant activities of *Origanum vulgare* L. ssp. *viride* (Boiss.) Hayek, a plant of traditional usage. *J Sci Food Agric*. 2015;95(4):786-798. doi:10.1002/jsfa.6903
 85. Kivilompolo M, Hyötyläinen T. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography in analysis of Lamiaceae herbs: Characterisation and quantification of antioxidant phenolic acids. *J Chromatogr A*. 2007;1145(1-2):155-164. doi:10.1016/j.chroma.2007.01.090

86. Tea Kulišić, Verica Dragović-Uzelac MM. Antioxidant Activity of Aqueous Tea Infusions Prepared from Oregano, Thyme and Wild Thyme. 2005. <http://www.ftb.com.hr/archives/75-volume-44-issue-no-4/371-antioxidant-activity-of-aqueous-tea-infusions-prepared-from-oregano-thyme-and-wild-thyme>. Accessed September 16, 2018.
87. Boskou M TD. Antioxidant Activity of Essential Oils from the Plants of the Lamiaceae Family. In: *Spices Herbs and Edible Fungi.* ; 1994:273-284.
88. Lagouri V, Blekas G, Tsimidou M, Kokkini S, Boskou D. Composition and antioxidant activity of essential oils from Oregano plants grown wild in Greece. *Z Lebensm Unters Forsch.* 1993;197(1):20-23. doi:10.1007/BF01202694
89. Aeschbach R, Löliger J, Scott BC, et al. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food Chem Toxicol.* 1994;32(1):31-36. doi:10.1016/0278-6915(84)90033-4
90. Yanishlieva, N.V. Marinova, E.M. Gordon, M.H. Raneva VG. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chem.* 1999.
91. Muñoz Centeno LM. *Plantas Medicinales Españolas: Origanum Vulgare L. (Lamiaceae) (Orégano).* (Universidad de Málaga S de P, ed.). Departamento de Biología Vegetal (Botánica y Fisiología Vegetal); 2002.
92. Vigano, J. da Fonseca Machado, A.P. MJ. Sub- and supercritical fluid technology applied to food waste processing. *J supercritic fluids.* 2015;96:272-286.
93. Castañeda-Ovando A, Pacheco-Hernández M de L, Páez-Hernández ME, Rodríguez JA, Galán-Vidal CA. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem.* 2009;113(4):859-871. doi:10.1016/j.foodchem.2008.09.001
94. Chew, K. K., Ng, S. Y., Thoo, Y. Y., Khoo, M. Z., Wan Aida WM, and Ho CW. Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of Centella asiatica extracts. *Int Food Res J.* 2011;18(4):571-578. doi:10.1016/j.jep.2007.07.023
95. D'Alessandro LG, Kriiaa K, Nikov I, Dimitrov K. Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Sep Sci Technol.* 2012;93:42-47.
96. Drosou C, Kyriakopoulou K, Bimpilas A, Tsimogiannis D, Krokida M. A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts. *Ind Crops Prod.* 2015;75:141-149. doi:10.1016/j.indcrop.2015.05.063

97. Vilkhukhu K, Mawson R, Simons L BD. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review. *Innov Food Sci Emerg.* 2008;9(2):161-169. doi:10.1016/j.ifset.2007.04.014
98. Corbin C, Fidel T, Leclerc EA, et al. Development and validation of an efficient ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from flax (*Linum usitatissimum* L.) seeds. *Ultrason Sonochem.* 2015;26:176-185. doi:10.1016/j.ultsonch.2015.02.008
99. Viganó JJM. Sequential extraction of phytochemicals from passion fruit bagasse using pressurized fluids. In: *International Symposium on Supercritical Fluids.* ; 2015:142.
100. Mason TJ. *Chemistry with Ultrasound.* Published for the Society of Chemical Industry by Elsevier Applied Science; 1990. <https://www.springer.com/us/book/9781851664221>. Accessed September 19, 2018.
101. Hoover K, Bhardwaj M, Ostiguy N, Thompson O. Destruction of bacterial spores by phenomenally high efficiency non-contact ultrasonic transducers. *Mater Res Innov.* 2002;6(5-6):291-295. doi:10.1007/s10019-002-0214-2
102. Luquedecastro M, Priegocapote F. Ultrasound-assisted crystallization (sonocrystallization). *Ultrason Sonochem.* 2007;14(6):717-724. doi:10.1016/j.ultsonch.2006.12.004
103. Dujmić F, Brnčić M, Karlović S, et al. Ultrasound-Assisted Infrared Drying of Pear Slices: Textural Issues. *J Food Process Eng.* 2013;36(3):397-406. doi:10.1111/jfpe.12006
104. Alzorqi I, Sudheer S, Lu T-J, Manickam S. Ultrasonically extracted β -d-glucan from artificially cultivated mushroom, characteristic properties and antioxidant activity. *Ultrason Sonochem.* 2017;35(Pt B):531-540. doi:10.1016/j.ultsonch.2016.04.017
105. Oroian M, Escriche I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Res Int.* 2015;74:10-36. doi:10.1016/j.foodres.2015.04.018
106. Galanakis CM, Goulas V, Tsakona S, Manganaris GA, Gekas V. A Knowledge Base for The Recovery of Natural Phenols with Different Solvents. *Int J Food Prop.* 2013;16(2):382-396. doi:10.1080/10942912.2010.522750
107. Kentish S FH. Applications of power ultrasound in food processing. 2014;5:263-284.
108. Santos-Zea L, Antunes-Ricardo M, Gutierrez-Urbe JA, García-Pérez J V., Benedito J. Effect of ultrasound transducer design on the acoustically-assisted supercritical fluid extraction of antioxidants from oregano. *Ultrason Sonochem.* 2018;47:47-56.

doi:10.1016/j.ultsonch.2018.04.019

109. FAO. *NORMA GENERAL PARA LOS HONGOS COMESTIBLES Y SUS PRODUCTOS. CODEX STAN 38-1981.*; 1981:10.
110. De Carvalho CSM, Sales-Campos C, De Andrade MCN. Mushrooms of the pleurotus genus: A review of cultivation techniques. *Interciencia.* 2010;35(3):177-182. doi:0378-1844/10/03/177-06
111. Arrúa, M., y Quintanilla J. Producción del hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*) a partir de las malezas *Paspalum fasciculatum* y *Rottboellia cochinchinensis*. 2007.
112. Gaitán- Hernández R. *Manual Práctico Del Cultivo de Setas : Aislamiento, Siembra y Producción.* Instituto de Ecología; 2004. <http://www.conacytprensa.mx/index.php/libro/17077-manual-practico-del-cultivo-de-setas>. Accessed September 19, 2018.
113. Muez y Pardo. La preparación del sustrato. In: *La Biología y El Cultivo de Pleurotus Spp.* ; 2001:159-186.
114. Sánchez y Royse. *La Biología y El Cultivo de Pleurotus Spp.*; 2001.
115. Carrión M.E., Ohaco Dominguez E.H. DMA. *Elaboración de Paté de Girgolas (Pleurotus Ostreatus): Caracterización Fisicoquímica y Evaluación Sensorial.*; 2016.
116. Ciappini, Cristina GB. *Pleurotus Ostreatus, una opción en el menú: estudio sobre las gírgolas en la dieta diaria.* 2004.
117. Ronda F. R de la CM y P V. *Enriquecimiento de Pan Sin Gluten Con Beta-Glucanos Extraídos Del Hongo Pleurotus Ostreatus.*; 2011.
118. Shanmugaprakasham Selvamani, Hesham Ali El-Enshasy DJD, Roslinda Abd Malek, Siti Zulaiha Hanapi KKA, Dalia Sukmawati OML and NM. Antioxidant Compounds of the Edible Mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Int J Biotechnol Wellness Ind.* 2018;7:1-14.
119. Gaytan-Hernandez, R., Salmones D, Pérez, R. y Mata G. Manual práctico del cultivo de setas. *Instituto de Ecología, Mexico.* 2002.
120. Corredor RAH, Rodriguez CLL. Evaluación del crecimiento y producción de *Pleurotus ostreatus* sobre diferentes residuos agroindustriales del departamento de cundinamarca. 2008.
121. Teissedre PL LN. Wine phenolics: contribution to dietary intake and bioavailability. *Food Res Int.* 2000;33:461-467.
122. Cheung C, KM L. Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *Agrocybe aegerita* var. *alba*. *Food Chem.* 2005;89:533-539.

123. Mariga AM, Yang W, Mugambi DK, et al. Antiproliferative and immunostimulatory activity of a protein from *Pleurotus eryngii*. *J Sci Food Agric*. 2014;94(15):3152-3162. doi:10.1002/jsfa.6665
124. Devi KSP, Roy B, Patra P, Sahoo B, Islam SS, Maiti TK. Characterization and lectin microarray of an immunomodulatory heteroglucan from *Pleurotus ostreatus* mycelia. *Carbohydr Polym*. 2013;94(2):857-865. doi:10.1016/j.carbpol.2013.02.017
125. Schneider I, Kressel G, Meyer A, Krings U, Berger RG, Hahn A. Lipid lowering effects of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in humans. *J Funct Foods*. 2011;3(1):17-24. doi:10.1016/j.jff.2010.11.004
126. Jayakumar T, Thomas PA GP. In-vitro anti-oxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 2009;10:228-234.
127. Barbut S, Wood J, Marangoni A. Potential use of organogels to replace animal fat in comminuted meat products. *Meat Sci*. 2016;122:155-162. doi:10.1016/j.meatsci.2016.08.003
128. Chin KB, Keeton JT, Longnecker MT, Lamkey JW. Low-fat Bologna In A Model System With Varying Types And Levels Of Konjac Blends. *J Food Sci*. 1998;63(5):808-813. doi:10.1111/j.1365-2621.1998.tb17905.x
129. Hughes E, Mullen AM, Troy DJ. Effects of fat level, tapioca starch and whey protein on frankfurters formulated with 5% and 12% fat. *Meat Sci*. 1998;48(1-2):169-180. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22062889>. Accessed September 19, 2018.
130. Akbarirad H, Ardabili AG, Kazemeini S mostafa, Khaneghah AM. An overview on some of important sources of natural antioxidants. *Int Food Res J*. 2016;23(3):928-933.
131. González LE, Giraldo GA, Duque AL. Periodo de cosecha y método de conservación del hongo comestible *pleurotus ostreatus*. *Ing Recur Nat y del Ambient*. 2011:117-125.
132. Jimenez J. Determinación de las condiciones de deshidratación de mora empleando aire caliente para la elaboración de una bebida natural en polvo. 2004.
133. Dr. Antonio De Michelis, Ing. Agr. Mabel Vullioud RR. *Experiencias En El Manejo de Pleurotus Ostreatus (Hongo de Cultivo) Para Conservas.*; 2009.
134. The Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*. 16 ed.; 1999.
135. Hara A, Radin NS. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal*

- Biochem.* 1978;90(1):420-426. doi:10.1016/0003-2697(78)90046-5
136. Prosky L, Asp N., Furda I, Devries J., Swhweizer T., Harland B. Determination of Total Dietary Fiber in Foods, Food Products: Collaborative Study. *J AOAC Int.* 1985;68(4):677-679.
 137. Zulueta A, Esteve MJ, Frígola A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chem.* 2009;114(1):310-316. doi:10.1016/j.foodchem.2008.09.033
 138. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A Novel Method for Measuring Antioxidant Capacity and its Application to Monitoring the Antioxidant Status in Premature Neonates. *Clin Sci.* 1993;84(4):407-412. doi:10.1042/cs0840407
 139. Barreto JC, Trevisan MTS, Hull WE, et al. Characterization and Quantitation of Polyphenolic Compounds in Bark, Kernel, Leaves, and Peel of Mango (*Mangifera indica* L.). *J Agric Food Chem.* 2008;56(14):5599-5610. doi:10.1021/jf800738r
 140. Pérez Jiménez J. Metodología para la evaluación de ingredientes funcionales antioxidantes: efectos de fibra antioxidante de uva en status antioxidante y parámetros de riesgo cardiovascular en humanos. 2007.
 141. Reza HM, Gias ZT, Islam P, et al. HPLC-DAD System-Based Phenolic Content Analysis and In Vitro Antioxidant Activities of Rice Bran Obtained from Aush Dhan (*Oryza Sativa*) of Bangladesh. *J Food Biochem.* 2015;39(4):462-470. doi:10.1111/jfbc.12154
 142. Irakli MN, Samanidou VF, Biliaderis CG, Papadoyannis IN. Development and validation of an HPLC-method for determination of free and bound phenolic acids in cereals after solid-phase extraction. *Food Chem.* 2012;134(3):1624-1632. doi:10.1016/j.foodchem.2012.03.046
 143. Luthria DL, Mukhopadhyay S, Kwansa AL. A systematic approach for extraction of phenolic compounds using parsley (*Petroselinum crispum*) flakes as a model substrate. *J Sci Food Agric.* 2006;86(9):1350-1358. doi:10.1002/jsfa.2521
 144. Šeruga M, Novak I, Jakobek L. Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chem.* 2011;124(3):1208-1216. doi:10.1016/j.foodchem.2010.07.047
 145. del Pino García R. Influencia del grado de tostado sobre la capacidad antioxidante y el efecto genoprotector del café soluble. Contribución de la fracción de melanoidinas. 2011.

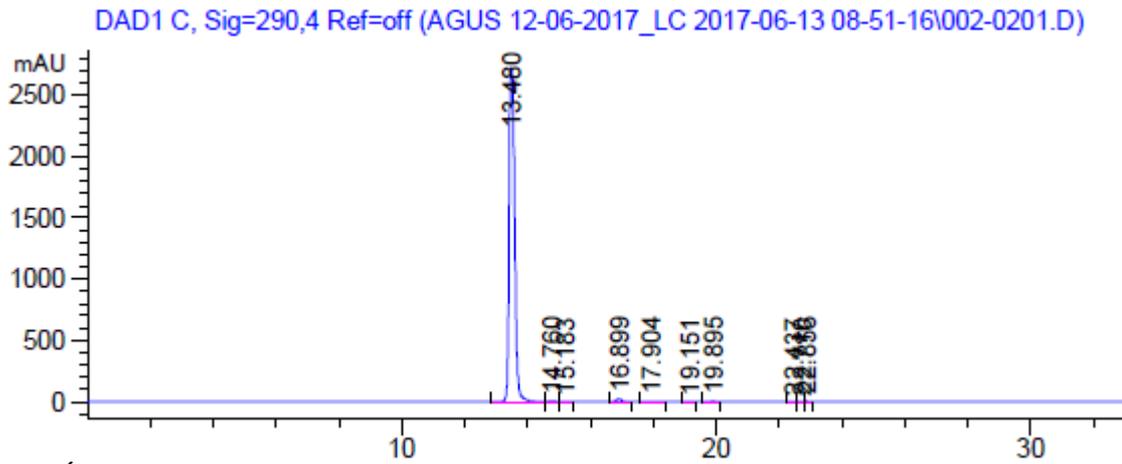
146. USDA. 02027, Spices, oregano, dried. National Nutrient Database for Standard Reference Legacy Release.
147. Olga Moreiras, Ángeles Carbajal LC y CC. *Tablas de Composición de Alimentos*. 16th ed. Pirámide; 2013.
148. <https://www.vegaaffinity.com/alimento/oregano-beneficios-informacion-nutricional--f79>.
149. <https://alimentos.org.es/proteinas-oregano-seco>.
150. <https://www.yazio.com/es/alimentos/oregano-seco.html>.
151. H.M. Santos JLC. Trends in ultrasonic-based equipment for analytical sample treatment. *Talanta*. 2007;73:795-802.
152. Martínez LJC, Ledezma IAL. Extracción y cuantificación de compuestos con actividad antioxidante a partir de cáscaras de tres variedades de papa (*solanum tuberosum*) en el departamento de nariño. 2013.
153. Mercado GM, Rosa LAD la, Wall A, Díaz JAL. Polyphenolic Compounds and antioxidant capacity of typically consumed species in Mexico. *Nutr Hosp*. 2013;28(1):36-46.
154. T. Oki, M. Masuda, M. Kobayashi, Y. Nishiba, S. Furuta IS. Polymeric procyanidins as radical-scavenging components in red-hulled rice. *J Agric Food Chem*. 2002;50:7524-7529.
155. Şahin S, Şamlı R. Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. *Ultrason Sonochem*. 2013;20(1):595-602. doi:10.1016/j.ultsonch.2012.07.029
156. Torres NCM. Efecto del ultrasonido en la extracción y nanoencapsulación de polifenoles de limón persa (*citrus latifolia*). 2017.
157. Proestos, C.; Lytoudi, K.; Mavromelanidou, O.K.; Zoumpoulakis, P.; Sinanoglou VJ. *Antioxidant Capacity of Selected Plant Extracts and Their Essential Oils.*; 2013.
158. Oniga I, Puşcaş C, Silaghi-Dumitrescu R, et al. *Origanum vulgare* ssp. *vulgare*: Chemical Composition and Biological Studies. *Molecules*. 2018;23(8):2077. doi:10.3390/molecules23082077
159. Matei AO, Gatea F, Radu GL. Analysis of Phenolic Compounds in Some Medicinal Herbs by LC–MS. *J Chromatogr Sci*. 2015;53(7):1147-1154. doi:10.1093/chromsci/bmu177
160. Hajimehdipoor H, Saeidnia S, Gohari A, Hamedani M, Shekarchi M. Comparative study of rosmarinic acid content in some plants of Labiatae family. *Pharmacogn*

- Mag.* 2012;8:37-41. doi:10.4103/0973-1296.93316
161. Lim YY, Lim TT, Tee JJ. Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. *Food Chem.* 2007;103(3):1003-1008. doi:10.1016/j.foodchem.2006.08.038
 162. Fitriana WD, Ersam T, Shimizu K, Fatmawati S. Antioxidant Activity of Moringa oleifera Extracts. *Indones J Chem.* 2018;16(3):297-301. doi:10.22146/ijc.21145
 163. Siddhuraju P1 BK. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *J Agric Food Chem.* 2003;51(8):2144-2155.
 164. Tornese M, Rossi ML, Coca F, Cricelli C, Troncoso A. Epidemiology and risk factors associated to foodborne and infant botulism: where and when?. *Rev Chilena Infectol.* 2008;25(1):22-27. doi:/S0716-10182008000100004
 165. María Daniela Mares Quiñones NNJ. *Componentes Antioxidantes En Especies de Hongos Silvestres Comestibles.*; 2013.
 166. Kozarski M, Klaus A, Jakovljevic D, et al. Antioxidants of Edible Mushrooms. *Molecules.* 2015;20(10):19489-19525. doi:10.3390/molecules201019489
 167. Kim M-Y, Seguin P, Ahn J-K, et al. Phenolic Compound Concentration and Antioxidant Activities of Edible and Medicinal Mushrooms from Korea. *J Agric Food Chem.* 2008;56(16):7265-7270. doi:10.1021/jf8008553
 168. Muszynska B, Ziaja; K, Ekiert H. Phenolic acids in selected edible basidiomycota species: *Armillaria mellea*, *Boletus badius*, *Boletus edulis*, *Cantharellus cibarius*, *Lactarius deliciosus* and *Pleurotus ostreatus*. *Acta Sci Pol.* 2013;12(4):107-116.

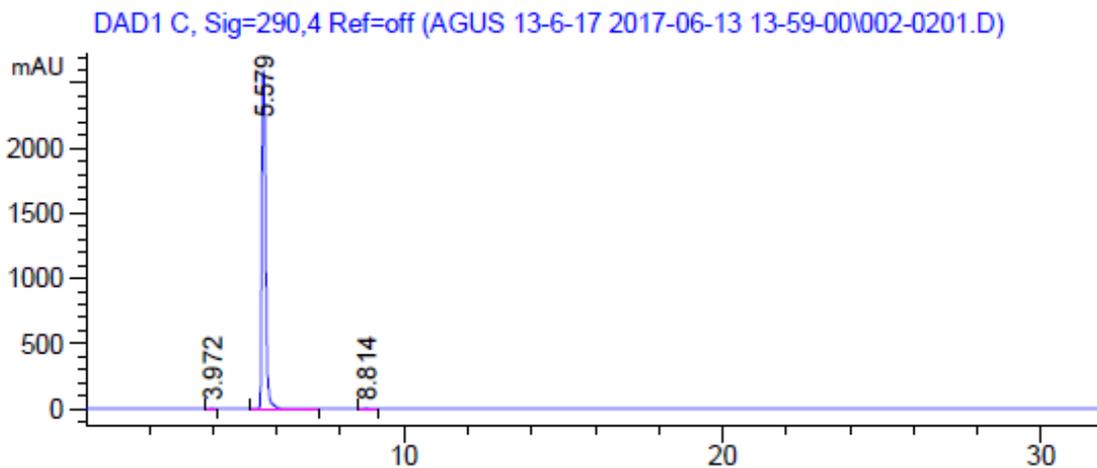
ANEXO

CROMATOGRAMAS PARA LAS SOLUCIONES PATRON UTILIZADAS EN EL ANÁLISIS POR HPLC:

➤ Ácido clorogénico:



➤ Ácido gálico:



➤ Ácido caféico:

