




# CAPACIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE ORÉGANO OBTENIDOS MEDIANTE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS



MASTER EN GESTIÓN Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

Presenta: Patricia Guadalupe Irianda Araujo  
Director: Dr. José Javier Benedito Fort  
Grupo de Análisis y Simulación de Procesos Agroalimentarios  
Departamento de Tecnología de Alimentos  
Universidad Politécnica de Valencia

---

---

# CAPACIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE ORÉGANO OBTENIDOS MEDIANTE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS.

Patricia G. Irianda, José J. Benedito

Grupo de Análisis y Simulación de Procesos Agroalimentarios, Departamento de Tecnología de Alimentos, Universidad Politécnica de Valencia.

## RESUMEN

Se ha evaluado la capacidad antimicrobiana y antioxidante de extractos de orégano obtenidos mediante fluidos supercríticos y se ha comparado con la técnica de extracción convencional (EC) sólido-líquido. Se estudió el efecto de la temperatura y de la presión en la extracción con fluidos supercríticos (EFSC), así como del solvente y de la temperatura en la EC sobre la concentración en compuestos fenólicos, capacidad antioxidante y antimicrobiana de los extractos. Los resultados muestran que en la EC el efecto del solvente y de la temperatura resultaron ser estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ), siendo el solvente Etanol/HCl (85:15; v/v) y la temperatura de 55°C las mejores condiciones de extracción. Ningún extracto convencional presentó capacidad antimicrobiana. En la EFSC la temperatura resultó tener un efecto estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ), no observándose un efecto claro de la presión. Los extractos obtenidos mediante EFSC poseen una elevada capacidad antimicrobiana sobre la *E. coli* DH1. La dosis mínima de extracto con poder de inhibición se encontró en el rango de 1.57 a 1.96 GAE (mg/l), medido en compuestos fenólicos. Así pues, la EFSC permite obtener extractos concentrados con alto poder antioxidante y antimicrobiano que pueden ser de uso directo ó para incorporar en los envases.

**PALABRAS CLAVE:** capacidad antimicrobiana, capacidad antioxidante, compuestos fenólicos, extracción convencional, extracción con fluidos supercríticos, orégano.

## RESUM

S'ha avaluat la capacitat antimicrobiana i antioxidant d'extractes d'oregano obtinguts per mitjà de fluids supercrítics i s'ha comparat amb la tècnica d'extracció convencional (EC) sòlid-líquid. Es va estudiar l'efecte de la temperatura i la pressió de l'extracció en fluids supercrítics (EFSC), així com el solvent i la temperatura en l'EC sobre la concentració en compostos fenòlics, capacitat antioxidant i antimicrobiana dels extractes. Els resultats mostren que en l'EC l'efecte del solvent i de la temperatura van resultar ser estadísticament significatius ( $p < 0.05$ ), sent el solvent Etanol/HCl (85:15; v/v) i la temperatura de 55°C les millors condicions d'extracció. Cap extracte

convencional va presentar capacitat antimicrobiana. En l'EFSC la temperatura va resultar tindre un efecte estadísticament significatiu ( $p < 0.05$ ); no observant-se un efecte clar de la pressió. Els extractes obtinguts per mitjà d'EFSC posseïxen una elevada capacitat antimicrobiana sobre la *E. coli* DH1. La dosi mínima d'extracte amb poder d'inhibició es va trobar en el rang de 1.57 a 1.96 GAE (mg/l), mesurat en compostos fenòlics. Així, doncs, l'EFSC permet obtindre extractes concentrats amb alt poder antioxidant i antimicrobià que poden, ser d'ús directe o per a incorporar en els envasos.

**PARAULES CLAU:** capacitat antimicrobiana, capacitat antioxidant, compostos fenòlics, extracció convencional, extracció amb fluids supercrítics, oregano.

## **ABSTRACT**

It has been assessed the antimicrobial and antioxidant ability of oregano extracts obtained by supercritical fluids and compared with the conventional solid-liquid extraction technique (EC). It has been studied the effect of temperature and pressure of the supercritical fluid extraction (EFSC) and the solvent and the temperature of the EC on the concentration of phenolic compounds, antioxidant capacity and antimicrobial activity of extracts. The results show that in EC the effect of solvent and temperature were statistically significant ( $p < 0.05$ ), being the solvent ethanol/HCl (85:15, v/v) and temperature of 55°C the best extraction conditions. Any conventional extract showed antimicrobial activity. In the EFSC temperature was found to have a statistically significant effect ( $p < 0.05$ ), however, the pressure didn't show a clear effect. The extracts obtained by EFSC have a high antimicrobial activity against *E. coli* DH1. The minimum inhibitory concentration of extract was found in the range of 1.57 to 1.96 GAE (mg/l), measured in phenolic compounds. Therefore, the EFSC allows to obtain concentrated extracts with high power antioxidant and antimicrobial capacity that can be of direct use or to incorporate them into packaging.

**KEY WORDS:** antimicrobial activity, antioxidant capacity, conventional extraction, oregano, phenolic compounds, supercritical fluid extraction.

## INTRODUCCIÓN

Los aditivos sintéticos se han empleado en alimentos durante décadas para su conservación. No obstante, se ha observado que el incremento en el consumo de estos compuestos han sido relacionados con problemas de salud y como consecuencia se ha reducido su aceptación en alimentos (Namiki, 1990). Las especias como el clavo, el ajo, el tomillo, la pimienta, el romero y el orégano, entre otros, han sido usadas desde tiempos ancestrales debido a sus propiedades medicinales y conservantes y porque además aportan flavor y aroma a los alimentos (Edris, 2007). En la actualidad numerosas investigaciones han demostrado que los aceites esenciales de estas especias aromáticas poseen propiedades antioxidantes y actividad biológica notable ante bacterias y hongos.

El orégano es una planta herbácea nativa de la región mediterránea usada como planta medicinal por sus poderosas propiedades antibacterianas y antifúngicas (Elgayyar et al., 2001; Sokovic et al., 2002). La capacidad antioxidante y antimicrobiana del orégano se atribuye a compuestos fenólicos como el timol, el carvacrol y ácidos fenólicos (Kokkini et al., 1997).

Los compuestos antioxidantes del orégano y otras especias han sido extraídos tradicionalmente mediante extracción sólido-líquido, usando solventes como metanol, etanol y acetona. Sin embargo, recientemente se ha incrementado el interés en la extracción con fluidos supercríticos (FSC) utilizando  $\text{CO}_2$  como solvente debido a que éste no es tóxico, puede recircularse, es barato, relativamente inerte, fácil de eliminar, no inflamable y mejora la calidad del producto y la capacidad de extracción (Balaban & Chen, 1992; Lang & Wai, 2001).

Esta técnica de extracción consiste en someter a un fluido ( $\text{CO}_2$ ) a condiciones por encima de su presión y temperatura críticas. En este estado, el fluido posee propiedades intermedias entre las de un líquido y un gas, manteniendo una alta difusividad propia de los gases y una alta densidad cercana a la de los líquidos. Al igual que los gases, la densidad de los FSC varía notablemente con la presión y la temperatura. Así pues, la propiedad más característica de los FSC es el amplio rango de altas densidades que pueden alcanzar, dependiendo de las condiciones de presión y/o temperatura empleadas. Dada la relación directa entre la densidad de un fluido con su poder de solubilidad, los fluidos supercríticos pueden variar notablemente su capacidad de extracción mediante pequeñas variaciones en la presión y/o temperatura. Teniendo en cuenta estas características, los FSC se convierten en disolventes ideales puesto que su elevada difusividad les permite penetrar a través de materias porosas y su capacidad de solvatación modulable les permite una gran versatilidad y selectividad según las condiciones de presión y temperatura a las que se sometan. Sin embargo, este tipo de extracción posee un inconveniente y es que, frecuentemente es difícil la extracción de componentes polares, por lo que para minimizar este efecto es necesario usar modificadores orgánicos como el etanol en pequeñas cantidades (Brunner, 2004).

El objetivo del trabajo fue determinar la capacidad antimicrobiana y antioxidante de los extractos de orégano obtenidos mediante FSC y compararla con la obtenida mediante la extracción convencional sólido-líquido con etanol. Se estudiaron los parámetros de proceso que permiten obtener la mejor capacidad antimicrobiana y antioxidante, tanto para la extracción convencional como para la extracción con fluidos supercríticos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Preparación de las muestras**

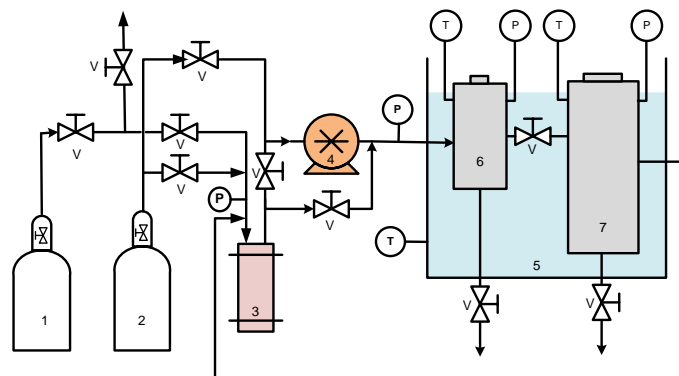
Se empleó orégano de la especie *Origanum vulgare L.* que fue comprado en el Mercado Central de Valencia. Se adquirieron veinte paquetes de 30 g cada uno. Estos paquetes se abrieron y se mezcló todo el orégano en una bolsa de mayor capacidad que se guardó cerrada en un lugar fresco y seco. De la misma se fueron tomando muestras para realizar posteriormente las experiencias de extracción.

### **Extracción convencional**

Para este tipo de extracción se ensayaron dos factores: el tipo de solvente y la temperatura de extracción, para lo cual se pesaron 6 g de muestra de orégano y se mezclaron con 200 ml de los diferentes solventes utilizados: etanol 96%, agua destilada, etanol/agua (1:1; v/v) y etanol/HCl (85:15; v/v). La extracción duró dos horas en agitación continua y se probaron tres temperaturas de extracción 35, 45 y 55° C para cada solvente. Los extractos obtenidos fueron filtrados con papel Whatman no.1. De cada uno de los extractos filtrados se tomaron 3 ml de muestra y se colocaron en un frasco de vidrio opaco de 5 ml de capacidad. A este extracto se le denominará **CM1**. El resto del extracto filtrado (a excepción del extracto etanol/HCl) se rotaevaporó a vacío a 45°C usando un rotavapor (VWR, RV/NB 10 digital, Staufen, Alemania) hasta un volumen final de 10 ml y se guardó en un frasco de vidrio opaco de la misma capacidad. A este extracto concentrado se le denominó **CM2**. Los extractos CM1 y CM2 fueron guardados en refrigeración a 4°C hasta llevar a cabo los análisis de capacidad antioxidante, compuestos fenólicos y capacidad antimicrobiana. Este último análisis se realizó para todos los extractos de CM1 a excepción del etanol/HCl, así como para el extracto etanólico de CM2 a todas las temperaturas ensayadas. Cada extracción se llevo a cabo por triplicado.

### **Extracción con fluidos subcríticos y supercríticos:**

Las experiencias para este tipo de extracción se llevaron a cabo en la planta de FSC del Grupo de Análisis y Simulación de Procesos Agroalimentarios (UPV). Este equipo está formado por un extractor de 200 ml de capacidad y un separador de 500 ml (*Figura 1*). La presión máxima de operación es de 700 bar, la planta también cuenta con dispositivos de control de presión y temperatura.



**Figura 1.** Esquema general de la planta de FSC. 1)Tanque N<sub>2</sub>, 2)Tanque CO<sub>2</sub>, 3)Enfriador, 4)Bombas, 5)Extractor, 6) Separador, V)Válvulas, P)Manómetros, T)Sondas de Temperatura.

Para este tipo de extracción se ensayaron dos factores: la presión y la temperatura de extracción, para lo cual se pesaron 10 g de muestra de orégano y se colocaron en el cartucho de extracción con adición de 20 ml de etanol como co-solvente. La extracción duró 2 horas y se probaron cuatro temperaturas: 25, 31 37.5 y 50°C para cada una de las presiones de extracción: 150, 350 y 550 bar. La presión del separador se mantuvo constante en 60 bar y el flujo de CO<sub>2</sub> a razón de 6.5 ml/min. La presión de la extracción se reguló manualmente con una microválvula. Al extracto obtenido se le denominó **FSM1**. El volumen de extracto obtenido varió según las condiciones de extracción entre 10 y 20 ml. De este extracto se guardaron 3 ml para realizar los análisis de compuestos fenólicos, capacidad antioxidante y capacidad antimicrobiana.

Después se lavó el extractor y el separador cada uno con 15 ml de etanol para recoger el extracto que quedó adherido en las paredes, el lavado recogido se mezcló con el resto de FSM1 y así se obtuvo **FSM2** al cual se le realizaron los ensayos de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante, a este extracto no se le evaluó la capacidad antimicrobiana por presentar menos concentración que FSM1.

Para determinar el efecto de la rotaevaporación en el extracto obtenido mediante FSC se realizó una experiencia a unas condiciones de extracción de 37.5°C/350 bar donde se tomó FSM2 y se concentró hasta un volumen de 5 ml utilizando un rotavapor a vacío a 45°C. El extracto obtenido se le denominó **FSM3** al cual se le realizaron los ensayos de compuestos fenólicos, capacidad antioxidante y capacidad antimicrobiana.

Todos los extractos (FSM1, FSM2 y FSM3) se guardaron en refrigeración a 4°C hasta llevar a cabo los análisis correspondientes. Cada extracción se realizó por triplicado.

### **Determinación de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante**

La capacidad antioxidante se determinó utilizando el método FRAP (Benzie & Strain, 1996). Los resultados se expresaron en  $\mu\text{mol/l}$  equivalentes de Trolox. Se realizaron 4 repeticiones para cada análisis.

El contenido total en compuestos fenólicos se determinó con el método de Folin Ciocalteu (Singleton et al., 1999). Los resultados fueron expresados en mg/l equivalentes de ácido gálico (GAE). Este análisis se realizó por triplicado para cada muestra.

### Capacidad antimicrobiana

Se determinó la capacidad antimicrobiana de los extractos obtenidos mediante EC y EFSC sobre dos cepas: la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli* DH1 y la levadura vínica *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin T73. Para cada una se realizó por triplicado la curva de crecimiento microbiano y el halo de inhibición por el método de difusión en agar.

Para los ensayos microbiológicos se utilizaron agar y caldo de cultivo de peptona-dextrosa para levadura (YPD) en el caso de *S. cerevisiae*, y Luria-Bertani (LB) para *E. coli*. La incubación fue a 27°C para la levadura y a 37°C para la bacteria.

En matraces erlenmeyer de 100 ml se colocaron 50 ml de medio de cultivo y 0.5 ml de extracto de orégano. Para los extractos obtenidos por FSC a 31°C para todas las presiones de extracción se probaron también alícuotas más pequeñas de extracto (0.25, 0.125, 0.1, 0.075, 0.0625 y 0.050 ml), con el fin de conocer la dosis mínima de extracto de orégano necesaria para inhibir el crecimiento de *E. coli* DH1. Posteriormente cada matraz fue inoculado con  $1 \times 10^7$  UFC/ml para *E. coli* y  $1 \times 10^6$  UFC/ml para la levadura. También se realizó un control por triplicado al que se le añadió etanol en la misma cantidad correspondiente a la alícuota del extracto adicionado.

Estos matraces fueron colocados en una cámara de incubación (J.P. SELECTA, Modelo 3000957, Barcelona, España) con un agitador orbital (J.P. SELECTA, Modelo rotabit 3000974, Barcelona España) a una velocidad de 150 U/min. Se tomaron muestras al inicio y cada 2 horas hasta completar 12 horas de crecimiento para medir la densidad óptica (OD) de las muestras por densitometría a 600 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro (Thermo Electron Corporation, Modelo Helios Gamma, Unicam, Inglaterra). El crecimiento del microorganismo se manifiesta en el aumento de turbidez del medio de cultivo y se relaciona con el incremento en la OD a partir de la curva de calibración previamente realizada (Vági et al., 2005).

La curva de crecimiento para ambos microorganismos se obtuvo graficando la media de las tres repeticiones de incremento en OD. Para corregir el error debido a la turbidez inicial con la que contribuye el extracto, se midió la absorbancia del medio de cultivo con el extracto y el resultado fue restado a todas las medidas de absorbancia tomadas cada 2 horas.

Para poder comparar la capacidad de inhibición de los diferentes extractos se determinó el porcentaje de inhibición a las 12 horas de incubación de los microorganismos mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = [(OD_C - OD_X) / OD_C] \times 100 \quad (1)$$

Donde:  $OD_C$  = densidad óptica del control etanólico a las 12 h (abs);  $OD_x$  = densidad óptica de la muestra a las 12 h (abs).

Para la determinación del halo de inhibición se prepararon cajas petri de agar, las cuales fueron sembradas en superficie con 100  $\mu$ l del microorganismo con una concentración de bacterias de  $1 \times 10^8$  de *E. coli* y  $1 \times 10^7$  de *S. cerevisiae*. Una vez inoculado se colocaron en cada placa de forma equidistante tres discos de difusión impregnados previamente con 20  $\mu$ l de extracto. Las placas se incubaron en una estufa incubadora (BINDER, Modelo FD115, Tuttlingen, USA) durante 24 horas, y después se midieron los diámetros del halo de inhibición para cada microorganismo.

### **Análisis estadísticos**

Utilizando el software estadístico Statgraphics 5.1, se realizaron análisis de varianza simple y de dos vías para poder determinar las diferencias significativas sobre las variables analizadas debidas a los diferentes efectos estudiados.

Así, en la extracción convencional se hicieron ANOVAS de dos vías para determinar las diferencias estadísticamente significativas en concentración de compuestos fenólicos y en capacidad antioxidante debidas al efecto del solvente y la temperatura de extracción de los extractos sin rotaevaporar CM1 y de los extractos rotaevaporados CM2.

En la extracción mediante fluidos subcríticos y supercríticos se realizaron ANOVAS de dos vías para apreciar las diferencias estadísticamente significativas en concentración de compuestos fenólicos, capacidad antioxidante y porcentaje de inhibición debidas a los efectos de la presión y la temperatura de extracción de los extractos directos FSM1 y de los extractos tras lavado FSM2 (a excepción del porcentaje de inhibición). También se hizo un ANOVA simple para encontrar las diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de inhibición de la *E. coli* DH1 debidas a la concentración en compuestos fenólicos de los extractos directos FSM1 (31°C/350 bar).

Para estudiar el efecto del tipo de extracción (convencional y supercrítica) y de la rotaevaporación, se realizaron ANOVAS simples para determinar las diferencias estadísticamente significativas sobre la concentración en compuestos fenólicos, en capacidad antioxidante y en el porcentaje de inhibición de la *E. coli* DH1 de los extractos sin rotaevaporar y rotaevaporados.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

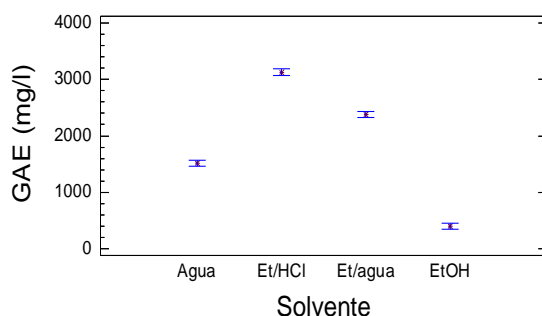
### Extracción convencional

#### EXTRACTOS SIN ROTAEVAPORAR

##### a) *Compuestos fenólicos*

Al realizar el ANOVA de dos vías del contenido en compuestos fenólicos de los extractos de orégano convencional CM1 se observó que hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la concentración de compuestos fenólicos para los diferentes solventes y temperaturas ensayadas.

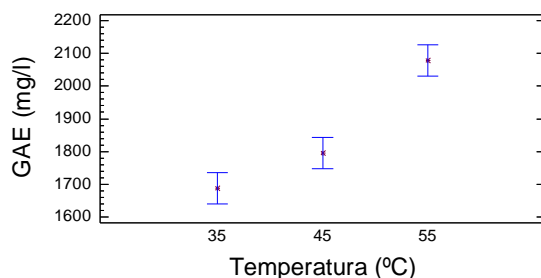
Efecto del solvente: La concentración en compuestos fenólicos resultó ser distinta según el tipo de solvente utilizado durante la extracción (*Figura 2*). Los valores más altos en compuestos fenólicos corresponden al extracto de etanol/HCl (85:15; v/v). De esta forma se puede observar que añadiendo un 15% de HCl se incrementa el poder de extracción del etanol en un 800%. Los valores más bajos en compuestos fenólicos corresponden a los extractos de etanol puro. Por otro lado, se observa que los extractos etanol/agua (1:1; v/v) presentan mayor eficiencia de extracción que los correspondientes al agua ó al etanol. Esto es debido a que el etanol y el agua tienen diferente polaridad y al mezclarse en proporciones iguales se incrementa la capacidad de extracción, ya que se extraen los compuestos fenólicos afines al agua y los compuestos fenólicos afines al etanol. Este efecto también fue observado por Shene et al. (2009) que realizaron extracciones de las hojas y del fruto de la murta, encontrando que una mezcla de 50% etanol/agua resultó más eficiente en la extracción de polifenoles que con los solventes puros (agua y etanol). También Trabelsi et al. (2010) en hojas de *limoniastrum monopetalum* observaron que la adición de un 20% de agua a otros solventes como el metanol, acetona ó etanol incrementaba el poder de extracción de los compuestos fenólicos.



**Figura 2.** Efecto del solvente sobre la concentración en compuestos fenólicos de los extractos de orégano CM1.

Efecto de la temperatura: Al incrementar la temperatura de extracción se observa un aumento en la cantidad de compuestos fenólicos que se logran

extraer, resultando la concentración en compuestos fenólicos diferente entre sí para todas las temperaturas ensayadas (*Figura 3*).



**Figura 3.** Efecto de la temperatura sobre la concentración en compuestos fenólicos de los extractos de orégano CM1.

### b) Capacidad antioxidante

Al realizar el ANOVA de dos vías de la capacidad antioxidante de los extractos de orégano convencional CM1 se observó que hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en ésta para los diferentes solventes y temperaturas ensayadas.

Efecto del solvente: La capacidad antioxidante resultó ser significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) según el solvente utilizado durante la extracción. Los resultados mostraron el mismo efecto del solvente que el encontrado para compuestos fenólicos de la *Figura 2*.

Efecto de la temperatura: Al incrementar la temperatura de extracción se observó un aumento en la capacidad antioxidante, resultando significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) entre sí para todas las temperaturas ensayadas.

### c) Capacidad antimicrobiana

En todos los extractos de orégano CM1 (etanol, agua y etanol/agua) no se observó capacidad antimicrobiana sobre ninguno de los dos microorganismos ensayados. La curva de crecimiento resultó idéntica al control y no se formaron halos de inhibición (datos no mostrados).

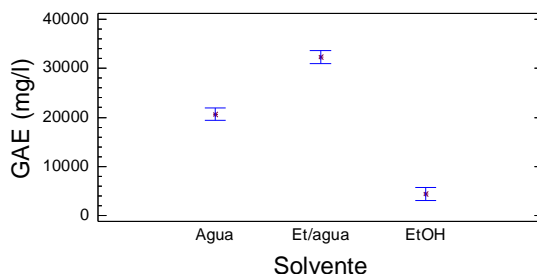
## EXTRACTOS ROTAEVAPORADOS

### a) Compuestos fenólicos

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en la concentración de compuestos fenólicos de los extractos rotaevaporados CM2 para los diferentes solventes y temperaturas ensayadas.

Efecto del solvente: La concentración en compuestos fenólicos resultó ser distinta según el tipo de solvente utilizado en la extracción, como se puede observar en la *Figura 4*. Los valores más altos en concentración de compuestos fenólicos corresponden al extracto de etanol/agua (1:1; v/v), lo que como se mencionó anteriormente ocurre debido al efecto sinérgico de la

mezcla agua/etanol. A pesar de que al rotaevaporar la concentración en compuestos fenólicos para el agua, el etanol/agua y el etanol aumenta en un 1400, 1300 y un 900% respectivamente, se puede observar que la rotaevaporación no modifica el efecto del solvente sobre la capacidad de extracción de compuestos fenólicos.



**Figura 4.** Efecto del solvente sobre la concentración en compuestos fenólicos de los extractos de orégano rotaevaporados CM2.

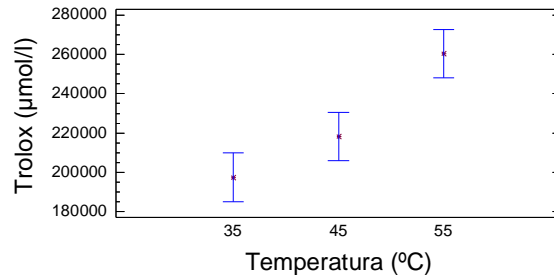
Efecto de la temperatura: Al incrementar la temperatura de extracción se observó un aumento en la concentración de compuestos fenólicos, similar al mostrado en la *Figura 2*. Sin embargo, así como en el caso de los extractos sin rotaevaporar las diferencias entre todas las temperaturas se dieron para todos los solventes, en los extractos rotaevaporados este hecho sólo se dio para el solvente etanol/agua. Para los otros dos solventes las diferencias se encuentran entre las temperaturas de 35 y 45°C respecto a la de 55°C. Este hecho podría deberse a que parte de los compuestos fenólicos se evaporan durante la rotaevaporación y otros pueden quedar adheridos a las paredes del rotavapor, aumentando la variabilidad y haciendo que no se aprecien las diferencias entre algunos tratamientos.

#### b) Capacidad antioxidante

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en la capacidad antioxidante de los extractos rotaevaporados CM2 para los diferentes solventes y temperaturas ensayadas.

Efecto del solvente: La capacidad antioxidante resultó ser diferente según el solvente utilizado durante la extracción, siguiendo el mismo patrón que la *Figura 3*.

Efecto de la temperatura: Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre las temperaturas de 35 y 45°C respecto a la de 55°C (*Figura 5*). Así pues, como se ha comentado anteriormente, la rotaevaporación interfiere sobre el efecto de la temperatura haciendo que no se observen diferencias significativas entre las temperaturas de 35 y 45°C.



**Figura 5.** Efecto de la temperatura sobre la capacidad antioxidante de los extractos rotaevaporados de orégano CM2.

### c) Capacidad antimicrobiana

En los extractos etanólicos de orégano rotaevaporados CM2 tampoco se observó capacidad antimicrobiana sobre ninguno de los dos microorganismos ensayados. La curva de crecimiento resultó idéntica al control y no se formaron halos de inhibición (datos no mostrados).

Así pues, no se observó efecto de la rotaevaporación sobre la capacidad antimicrobiana de los extractos rotaevaporados CM2 a pesar de que éstos presentaran mayor concentración en compuestos fenólicos y en capacidad antioxidante. Este hecho puede ser debido a que en la extracción convencional no se logran extraer compuestos que tengan capacidad antimicrobiana y que inhiban el crecimiento de los dos microorganismos ensayados y/o que el largo proceso de rotaevaporación conlleve la pérdida de los componentes antimicrobianos por evaporación.

## Extracción con fluidos subcríticos y supercríticos

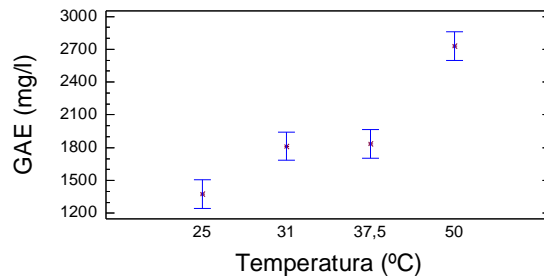
### EXTRACTOS DIRECTOS

#### a) Compuestos fenólicos

Al realizar el ANOVA de dos vías de la concentración en compuestos fenólicos de los extractos de orégano subcríticos y supercríticos FSM1 se observó que existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) tanto para la temperatura, como para la presión de extracción.

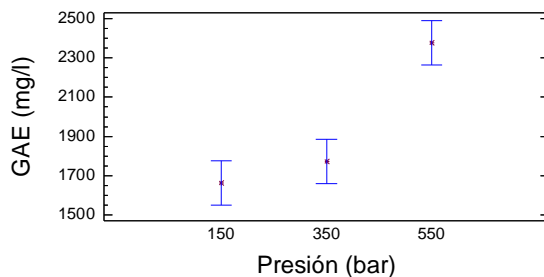
Efecto de la temperatura: Los resultados de concentración en componentes fenólicos en función de la temperatura de extracción muestran tres grupos bien definidos (*Figura 6*). La temperatura de extracción subcrítica de 25°C presenta menor concentración en compuestos fenólicos que todas las temperaturas iguales ó por encima del punto crítico (31°C). Las temperaturas de 31 y 37.5°C no presentan diferencias estadísticamente significativas y la mayor concentración de componentes fenólicos corresponde a la temperatura de extracción de 50°C. Este mismo comportamiento lo observó Reverchon (1997) que trabajó con extracción mediante fluidos supercríticos de aceites esenciales y el fraccionamiento de éstos. Así pues, la concentración en compuestos fenólicos se incrementa significativamente al pasar de la fase subcrítica a la supercrítica,

encontrándose un aumento de la capacidad de extracción a 50°C, respecto a temperaturas inferiores a 37.5°C.



**Figura 6.** Efecto de la temperatura sobre la concentración en compuestos fenólicos de los extractos de orégano FSM1.

Efecto de la presión: La concentración en compuestos fenólicos de los extractos FSM1 resultó no mostrar diferencias significativas entre las presiones de trabajo de 150 bar y 350 bar. No obstante, la presión de 550 bar es la que mayor capacidad de extracción presentó ya que es la que logra extraer mayor concentración de estos compuestos (*Figura 7*).



**Figura 7.** Efecto de la presión sobre la concentración en compuestos fenólicos de los extractos de orégano FSM1.

### b) Capacidad Antioxidante.

Al realizar el ANOVA de dos vías de la capacidad antioxidante de los extractos de orégano subcríticos y supercríticos FSM1 se observó que existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) tanto para la temperatura, como para la presión de extracción.

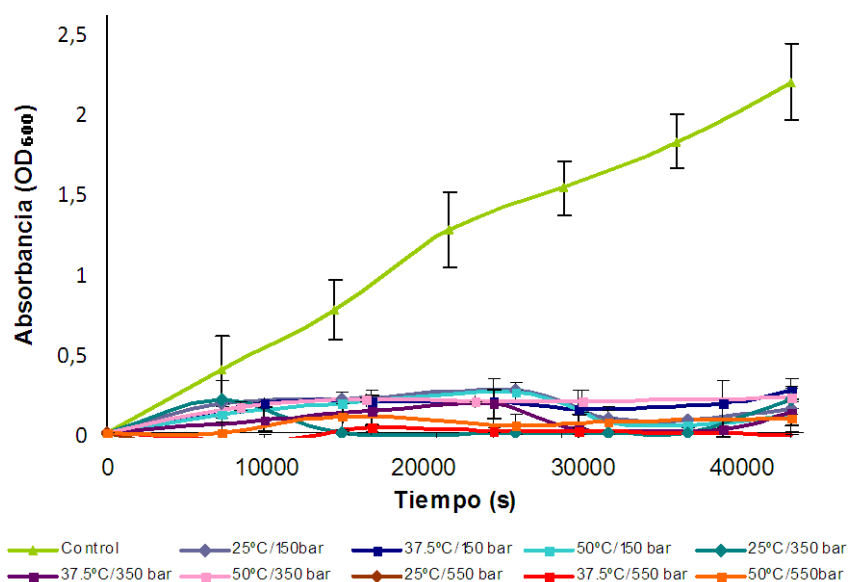
Efecto de la temperatura: Los resultados del efecto de la temperatura sobre la capacidad antioxidante de los extractos FSM1 muestran el mismo comportamiento que para la concentración en compuestos fenólicos (*Fig. 6*).

Efecto de la presión: Los resultados del efecto de la presión sobre la capacidad antioxidante de los extractos muestran el mismo comportamiento que para la concentración en compuestos fenólicos (*Figura 7*).

### c) Capacidad Antimicrobiana

Los extractos obtenidos mediante fluidos subcríticos y supercríticos FSM1 para todas las condiciones ensayadas presentaron una elevada capacidad antimicrobiana sobre la *E. coli* DH1, cómo lo muestran las curvas

de crecimiento de la *Figura 8*. Sin embargo, los extractos no presentaron capacidad antimicrobiana sobre la levadura donde la curva de crecimiento fue idéntica al control y no se observaron halos de inhibición (datos no mostrados).

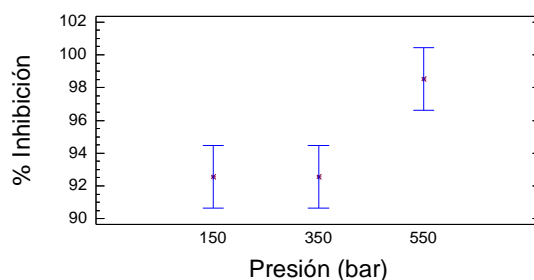


**Figura 8.** Curvas de crecimiento de *E. coli* DH1 con adición de 0.5 ml de extracto FSM1 de orégano obtenido mediante diferentes condiciones de extracción (temperatura/presión).

La inhibición en el crecimiento de la bacteria se manifestó prácticamente deteniendo el crecimiento durante las 12 horas de incubación. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) en el porcentaje de inhibición debido a la temperatura de extracción. Sin embargo, se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre las presiones de 150 y 350 bar respecto a la de 550 bar (*Figura 9*). Estas diferencias en el porcentaje de inhibición fueron debidas fundamentalmente a las diferencias existentes a la temperatura de extracción de 25°C.

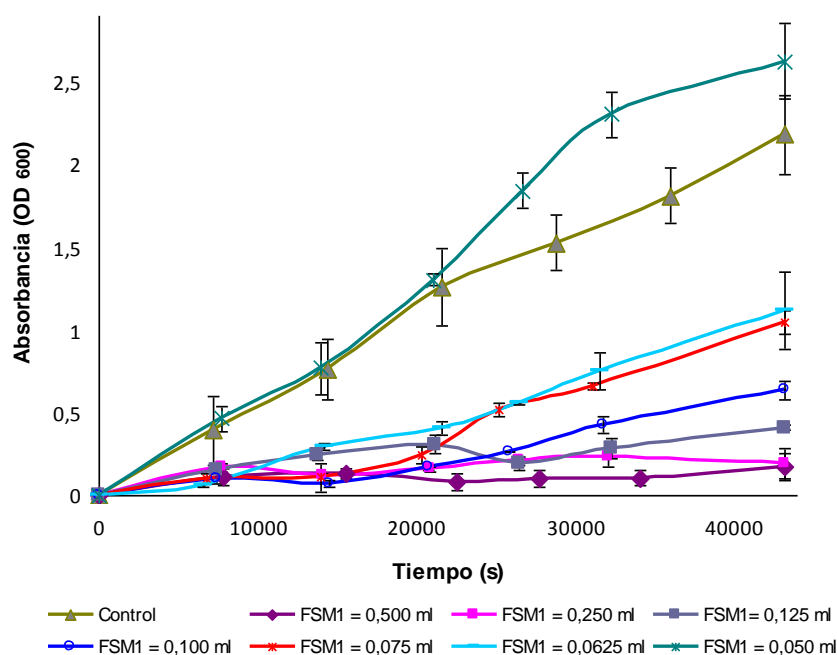
De la *Figura 9* se desprende que se obtiene mayor inhibición de la *E. coli* DH1 cuando se somete al orégano a extracciones con presiones altas.

El hecho de que no se encuentren diferencias significativas entre las temperaturas y algunas presiones puede ser debido a que la concentración de extracto ensayada es muy elevada y superior a la mínima necesaria para la inhibición, independientemente de las condiciones de extracción ensayadas. En este sentido es importante conocer la concentración mínima con poder de inhibición. Por esto, se adicionaron diferentes dosis de los extractos obtenidos a 31°C y 350 bar, representando las curvas de crecimiento así obtenidas.



**Figura 9.** Efecto de la presión (bar) sobre el % de inhibición de la *E. coli* DH1 de los extractos de orégano FSM1.

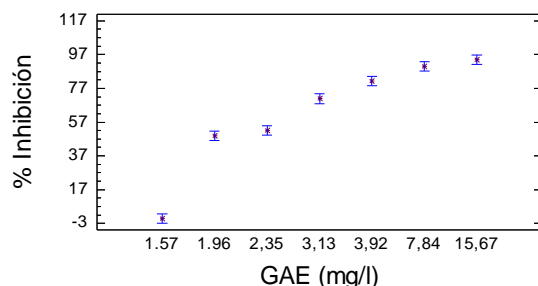
En la *Figura 10* se observa que al disminuir la dosis del extracto FSM1 adicionado, disminuye progresivamente el porcentaje de inhibición sobre la *E. coli*. Este efecto lo observaron también Vági et al. (2005), quienes trabajaron adicionando diferentes dosis de extractos supercríticos de *Origanum majorana L.* a diferentes medios de cultivos inoculados con bacterias y hongos para evaluar la capacidad antimicrobiana y antifúngica de los extractos, así como las dosis mínimas de extracto requeridas para la inhibición de los microorganismos que ensayaron.



**Figura 10.** Curvas de crecimiento de *E. coli* DH1 con adición de diferentes volúmenes de extracto FSM1 de orégano con condiciones de extracción: 31°C/350 bar.

En la *Figura 11* se observa que al variar la concentración de compuestos fenólicos de los extractos FSM1 adicionados al medio de cultivo inoculado, aumenta significativamente ( $p < 0.05$ ) el porcentaje de inhibición sobre la *E. coli*. Así pues, para una concentración de compuestos fenólicos entre 1.57 y 1.96 GAE (mg/l) de extracto se observa un incremento notable del poder de inhibición, pasando de no inhibir el crecimiento bacteriano a inhibirlo en un

50%. De 1.96 a 3.92 GAE (mg/l) de extracto adicionado, aumenta la inhibición hasta llegar a una concentración de 7.84 GAE (mg/l), donde un incremento en la concentración de compuestos fenólicos no supone un aumento en la capacidad de inhibición.



**Figura 11.** Efecto del volumen del extracto de orégano (31°C/350 bar) FSM1 añadido sobre el porcentaje de Inhibición de la *E. coli* DH1.

El diámetro del halo de inhibición se encontró entre 8 y 20.5 mm. Sin embargo, no se encontró una relación entre el diámetro del halo de inhibición y los diferentes factores estudiados, lo que se atribuyó a la elevada variabilidad de la técnica. Por lo tanto, el método de difusión agar para la determinación de los halos de inhibición no se consideró adecuado para evaluar la capacidad antimicrobiana de los extractos estudiados.

## EXTRACTOS TRAS LAVADO

### a) Compuestos Fenólicos

El análisis estadístico muestra que existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la concentración en compuestos fenólicos de los extractos de orégano subcríticos y supercríticos FSM2 debido a la temperatura de extracción. Sin embargo, la presión de extracción resulta no ser un factor significativo ( $p > 0.05$ ).

Efecto de la temperatura: Los resultados del efecto de la temperatura sobre la concentración en compuestos fenólicos de los extractos FSM2 muestran el mismo comportamiento que los extractos FSM1 (Figura 6).

Efecto de la presión: No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración en compuestos fenólicos de los extractos FSM2 debido a la presión de extracción (Figura 12). Así pues, a presión más baja el extracto depositado sobre las paredes de los depósitos extractor y separador es mayor, haciendo que el extracto FSM1 fuera menos concentrado (Figura 7). Al lavar y recoger con etanol los compuestos fenólicos adheridos a las paredes desaparece el efecto de la presión.

### b) Capacidad Antioxidante

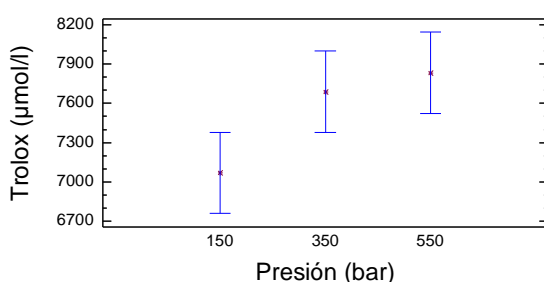
Los resultados del ANOVA de dos factores muestran que hay diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en la capacidad antioxidante de los



extractos de orégano subcríticos y supercríticos en función de la temperatura y de la presión de extracción.

Efecto de la temperatura: Los resultados del efecto de la temperatura sobre la capacidad antioxidante de los extractos FSM2 muestran de manera generalizada que conforme se incrementa la temperatura de extracción aumenta la capacidad antioxidante, observándose tres grupos con diferencias estadísticamente significativas ( $25^{\circ}\text{C} < 31 = 37.5 < 50^{\circ}\text{C}$ );  $p < 0.05$ . Este comportamiento es el mismo que se vio anteriormente en la *Figura 6*.

Efecto de la presión: Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la capacidad antioxidante de los extractos FSM2 debido a la presión de extracción, resultando que la capacidad antioxidante del extracto de 150 bar es inferior respecto de las presiones de 350 y 550 bar (*Figura 12*).



**Figura 12.** Efecto de la presión sobre la capacidad antioxidante de los extractos de orégano FSM2 tras lavado.

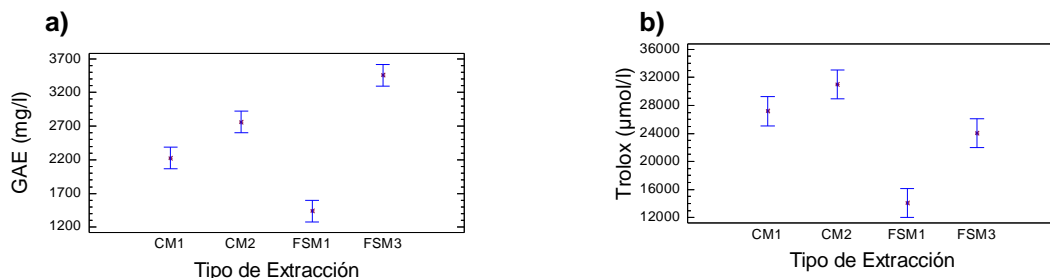
### **Efecto del tipo de extracción y de la rotaevaporación sobre la concentración en compuestos fenólicos, capacidad antioxidante y antimicrobiana.**

Para comparar el efecto del tipo de extracción y de la rotaevaporación sobre los ensayos realizados se realizaron cuatro tipos de extracciones: una extracción convencional directa CM1 a  $35^{\circ}\text{C}$  utilizando etanol/agua (1:1; v/v) como solvente para la extracción, una extracción convencional rotaevaporada CM2 a  $35^{\circ}\text{C}$  con etanol como solvente. Para las extracciones con fluidos supercríticos directas FSM1 y rotaevaporadas FSM3 se realizaron extracciones con condiciones de proceso a  $37.5^{\circ}\text{C}$  y 350 bar.

Se observó que tanto los compuestos fenólicos como la capacidad antioxidante resultaron ser estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ) entre todos los extractos comparados.

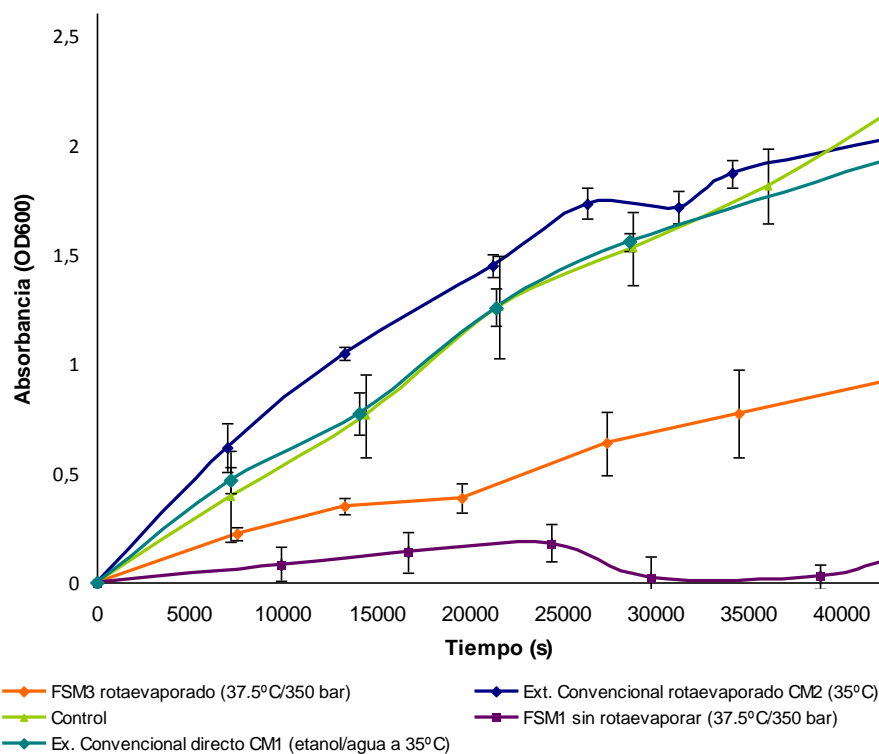
Al rotaevaporar se incrementa la concentración en compuestos fenólicos de los extractos convencionales CM2 y de los extractos mediante fluidos supercríticos FSM3. La concentración en compuestos fenólicos para los extractos rotaevaporados FSM3 aumenta en un 432% respecto a FSM1 (*Figura 14a*) y un 933% para CM2 (etanol, *Figura 14a*) respecto a CM1 (etanol, 291 GAE en mg/l). Como se puede observar en la *Figura 14 a*), el extracto supercrítico rotaevaporado FSM3 es el que posee mayor concentración en compuestos fenólicos, seguido del extracto convencional rotaevaporado CM2 (etanol), luego el extracto convencional directo CM1(etanol/agua) y por último el extracto supercrítico directo FSM1.

El efecto de la rotaevaporación incrementa el poder antioxidante del extracto. Sin embargo, en este caso (*Figura 14 b*) los extractos convencionales, tanto el directo CM1 (etanol/agua) como el rotaevaporado CM2 (etanol) presentan la mayor capacidad antioxidante.



**Fig. 14 a y b.** Efecto del tipo de extracción y de la rotaevaporación sobre la concentración en compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante.

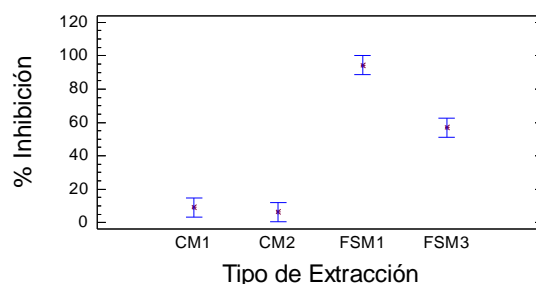
Con los resultados anteriores puede esperarse que los extractos concentrados mediante rotaevaporación tanto para la extracción convencional CM2 como para la supercrítica FSM3 sean los que posean una mayor capacidad antimicrobiana ya que contienen una mayor cantidad de compuestos fenólicos y una elevada capacidad antioxidante. Sin embargo, al representar las curvas de crecimiento de *E. coli* DH1 para cada uno de los extractos (*Figura 15*) se observa justamente lo contrario a lo esperado.



**Figura 15.** Efecto del tipo de extracto de orégano adicionado sobre el crecimiento de *E. coli* DH1.

Cuando se realiza el ANOVA para estudiar el efecto del tipo de extracto sobre el porcentaje de inhibición de *E. coli* DH1, se observan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Como se pueden observar en las Figuras 15 y 16, los extractos convencionales directos CM1 no mostraron capacidad antimicrobiana sobre la *E. coli*, a pesar de contener mayor concentración de compuestos fenólicos que los extractos mediante fluidos supercríticos directos FSM1. No obstante, éstos últimos inhibieron prácticamente por completo el crecimiento de esta cepa.

Al rotaevaporar los extractos se observa que los convencionales rotaevaporados CM2 continúan sin mostrar actividad antimicrobiana, a pesar de contener mayor concentración en compuestos fenólicos después de concentrar rotaevaporando. Sin embargo, tras rotaevaporar los extractos mediante fluidos supercríticos FSM3 continúan mostrando capacidad de inhibición pero en un porcentaje inferior al extracto mediante fluidos supercríticos directo FSM1. Por lo tanto, se puede concluir que la extracción convencional no permite extraer compuestos antimicrobianos que inhiban el crecimiento de la *E. coli*. Por el contrario, los extractos mediante fluidos supercríticos permiten extraer compuestos con capacidad antimicrobiana que inhiben el crecimiento de *E. coli* DH1. También se ha comprobado que al rotaevaporar para concentrar un extracto supercrítico se afecta a la capacidad de inhibición de la *E. coli* DH1 ya que reduce su inhibición aproximadamente en un 40% debido a que los compuestos con capacidad antimicrobiana se quedarían pegados a las paredes del matraz balón o se perderían por evaporación. En la línea de mostrar la volatilidad de los compuestos antimicrobianos del orégano, Becerril et al. (2007) trabajaron con aceites esenciales (AE) de orégano y canela observando que la mayor actividad antimicrobiana de los AE se produce en la fase vapor, resultando ser más eficiente incluso que la aplicación directa sobre las cepas microbianas que ensayaron. También López et al. (2007) encontraron que el carvacrol es el compuesto antimicrobiano que se encuentra en mayor proporción en los AE de orégano y que la capacidad de inhibición de este compuesto es debido principalmente a su fase vapor.



**Figura 16.** Efecto del tipo de extracción en el porcentaje de inhibición de la *E. coli* DH1.

## **CONCLUSIONES:**

En la extracción convencional se observaron diferencias estadísticamente significativas sobre la concentración en compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante debidas al tipo de solvente y a la temperatura de extracción para los extractos sin rotaevaporar CM1 y rotaevaporados CM2. El hecho de adicionar un 15% (v) de HCl ó un 50% (v) de agua al etanol incrementa el poder de extracción de compuestos fenólicos y aumenta la capacidad antioxidante debido al efecto sinérgico del etanol con los solventes mencionados. La rotaevaporación no modifica el efecto del solvente sobre la capacidad de extracción de compuestos fenólicos ni sobre la capacidad antioxidante. Este tipo de extracción no presentó capacidad antimicrobiana.

En la extracción mediante fluidos supercríticos se observaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración en compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante debidas a la temperatura de extracción de los extractos directos FSM1 y tras lavado FSM2. No se encontró un efecto claro de la presión. Los extractos subcríticos y supercríticos ensayados a todas las condiciones de extracción (presión/temperatura) mostraron capacidad antimicrobiana sobre *E. coli* DH1, pero no sobre *S. cerevisiae* T73. La aparición del poder de inhibición de los extractos obtenidos a 31°C y 350 bar se produce en el rango de 1.57 a 1.96 GAE (mg/l) medido en compuestos fenólicos. Los extractos obtenidos mediante fluidos supercríticos permiten extraer compuestos con capacidad antimicrobiana que no se obtienen con la extracción convencional.

La rotaevaporación supone un aumento en la concentración de compuestos fenólicos y en la capacidad antioxidante tanto en la extracción convencional como en la extracción mediante fluidos supercríticos. Sin embargo, reduce la capacidad antimicrobiana debido a la evaporación de compuestos con estas propiedades.

Los extractos obtenidos mediante fluidos supercríticos pueden ser utilizados como potentes antioxidantes y antimicrobianos, sustituyendo a los aditivos convencionales.

## **AGRADECIMIENTOS:**

A todo el Grupo ASPA por ser una familia para mí, en especial a Carmi y al director del presente trabajo Dr. José Javier Benedito Fort por su dedicación y paciencia.

A mis profesores del ICA de la Universidad de Guanajuato que siempre han procurado por mí.

Agradezco a mis padres por motivarme a seguir superándome y a mis hermanos por apoyarme siempre en mis decisiones.

Un muy especial agradecimiento a mi esposo Gonzalo por todo su amor y apoyo, este trabajo es gracias a ti.

## REFERENCIAS:

1. Balaban, M.O., Chen, C.S. 1992. Supercritical fluid extraction: applications for the food industry, (Ed.) Y.H. Hui, Encyclopedia of Food Science and Technology, Vol. 4, 2444–2449.
2. Becerril, R.; Gómez-Lus, R.; Goñi, P.; López, P.; Nerín, C. 2007. Combination of Analytical and Microbiological Techniques to Study the Antimicrobial Activity of a New Active Food Packaging Containing Cinnamon or Oregano against *E. coli* and *S. aureus*. *Anal Bioanal Chem*, **388**:1003-1011.
3. Benzie, I.F.F.; Strain, J.J. 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of Antioxidant Power: the FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, **239**:70-76.
4. Brunner, G. 2004. Supercritical Fluids: Technology and Application to Food Processing – a Practical Review. *Journal of Food Engineering*, **67**:21-33.
5. Edris, A.E. 2007. Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and their Individual Volatile Constituents: a Review. *Phytother Res.*, **21**:308-323.
6. Elgayyar, M.; Draughon, F.A.; Golden, D.A.; Mount, J.R. 2001. Antimicrobial Activity of Essential Oils from Plants Against selected Pathogenic and Saprophytic Microorganisms. *J. Food Prot.*, **64**:1019-1024.
7. Kokkini, S.; Karousou, R.; Dardioti, A.; Krigas, N.; Lanaras, T. 1997. Autumn Essential Oils of Greek Oregano. *Phytochemistry*, **44**:883-886.
8. Lang, Q.; Wai, C.M. 2001. Supercritical Fluid Extraction in Herbal and Natural Product Studies—a Practical Review, *Talanta*, **53**:771–782.
9. López, P.; Sánchez, C.; Batlle, R.; Nerín, C. 2007. Vapor-Phase Activities of Cinnamon, Thyme and Oregano Essential Oils and Key Constituents against Foodborne Microorganisms. *Journal of Food Agricultural and Food Chemistry*, **55**:4348-4356.
10. Namiki, M. 1990. Antioxidant/antimutagens in food. *Food Science and Nutrition*, **29**:273–300.
11. Reverchon, E. 1997. Supercritical Fluid Extraction and Fractionation of Essential Oils and related Products. *Journal of Supercritical Fluids*, **10**: 1-37.
12. Shene, C.; Reyes, A.K.; Villarroel, M.; Sineiro, J.; Pinelo, M.; Rubilar, M. 2009. Plant Location and Extraction Procedure Strongly Alter the Antimicrobial Activity of Murta Extracts. *Eur Food Res Technol.*, **228**:467-475.
13. Singleton, V.L.; Ortholer, R.; Lamuela-Raventos, R.M. 1999. Analysis of total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Meth Enzymol*, **299**:152-78.
14. Sokovic, M.; Tzakou, O.; Pitarokili, D.; Couladis, M. 2002. Antifungal Activities of Selected Aromatic Plants Growing Wild in Greece. *Nahrung*, **46**:317-320.
15. Trabelsi, N.; Megdiche, W.; Ksouri, R.; Falleh, H.; Oueslati, S.; Soumaya, B.; Hajlaoui, H.; Abdelly, C. 2010. Solvent Effects on Phenolic Contents and Biological Activities of the Halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *Food Science and Technology*, **43**:632-639.
16. Vági, E.; Simándi, B.; Suhajda, Á.; Héthelyi, É. 2005. Essential Oil Composition and Antimicrobial Activity of *Origanum majorana* L. Extracts Obtained with Ethyl Alcohol and Supercritical Carbon Dioxide. *Food Research International*, **38**:51-57.