



Determinación de timol y carvacrol en una matriz orgánica de alimento para cerdo utilizando Headspace SPME-GC-MS



Fernando Jonathan Lona-Ramírez ^a

Nancy Lizeth Hernández-López ^a

Guillermo González-Alatorre ^a

Teresa del Carmen Flores-Flores ^a

Rosalba Patiño-Herrera ^a

José Francisco Louvier-Hernández ^{a*}

^a Tecnológico Nacional de México en Celaya. Departamento de Ingeniería Química. Guanajuato, México.

*Autor de correspondencia: francisco.louvier@itcelaya.edu.mx

Resumen:

En los últimos años, el aceite esencial de orégano se ha utilizado como aditivo en alimentos para animales debido a sus propiedades antifúngicas y antibacterianas, así como sustituto sintético de antibióticos. Es deseable desarrollar un método rápido y efectivo de cuantificación de timol y carvacrol en una matriz orgánica de alimento para cerdo. En este trabajo se realiza una comparación de rendimiento entre la técnica de extracción con disolvente Soxhlet utilizando éter de petróleo y acetato de etilo y la técnica de microextracción en fase sólida en el espacio de cabeza (HS-SPME). Se realizó un diseño de experimentos 2^4 para definir los parámetros de HS-SPME: temperatura de equilibrio de 40 °C, temperatura de extracción de 40 °C, fuerza iónica de 0.57 M y tiempo de extracción de 40 min. El método HS-SPME es más eficiente para la extracción de timol y carvacrol de una matriz orgánica. Los límites de los valores de detección y cuantificación utilizando la extracción Soxhlet con acetato de etilo fueron de 3.7 y 12.5 μl^{-1} para timol y de 1.4 y 4.7 μg

L^{-1} para carvacrol, respectivamente; mientras que el LDD y el LDC para HS-SPME fueron de 0.9 y 3.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ para timol y de 0.6 y 1.9 $\mu\text{g L}^{-1}$ para carvacrol, respectivamente. El método de microextracción en fase sólida en el espacio de cabeza tiene el potencial de control de calidad en la industria para compuestos activos presentes en el aceite esencial de orégano como aditivo en una matriz orgánica.

Palabras clave: Aceite esencial, Timol, Carvacrol, Orégano, *Origanum*, HS-SPME-GC-MS.

Recibido: 17/08/2020

Aceptado: 02/09/2021

Introducción

Las personas utilizan especias herbales como potenciadores del sabor de los alimentos y ayudas medicinales desde la antigüedad⁽¹⁾, principalmente por su actividad biológica. El orégano es una de las hierbas más importantes, que es el nombre común de una amplia variedad de géneros y especies de plantas en todo el mundo, pero generalmente se le conoce como *Origanum* en la familia *Lamiaceae* (*Labiatae*)⁽²⁾ o *Lippia graveolens* en la familia *Verbenaceae*. El aceite esencial de orégano (AEO) ha sido utilizado como aditivo alimentario debido a su actividad antimicrobiana atribuida a su alto contenido de monoterpenos como el timol y el carvacrol, el último generalmente reconocido como un aditivo alimentario seguro⁽³⁻⁶⁾. Debido a la prohibición de los antibióticos por parte de la Comisión Europea, el AEO ha recibido una mayor atención por parte de la industria avícola y porcina para mejorar las defensas naturales y fortalecer los organismos de los animales con resultados favorables⁽⁷⁻¹⁰⁾. El AEO se puede incorporar al alimento para cerdo mezclando el aceite y la matriz orgánica. Sin embargo, se requiere un método de cuantificación confiable para el control de calidad.

El timol y el carvacrol⁽¹¹⁾ muestran actividad antibacteriana^(4,12), antioxidante⁽¹³⁾ y fungicida^(3,4) y son dos de los principales componentes del AEO. Por lo tanto, pueden servir como marcadores para la cuantificación. El método de control de calidad comienza con una extracción con disolvente de los compuestos volátiles de la matriz del alimento; sin embargo, los disolventes orgánicos no son respetuosos con el medio ambiente ni aceptables para el procesamiento de alimentos. Algunas otras tecnologías de extracción, como la extracción con dióxido de carbono supercrítico, requieren equipos de alto costo y condiciones operativas de alta presión^(14,15). Por lo tanto, es deseable desarrollar un método rápido y efectivo de cuantificación de timol y carvacrol dentro de una matriz orgánica de alimento para cerdo. Se propone la técnica de microextracción en fase sólida en el espacio de cabeza (HS-SPME, del

inglés *headspace solid-phase microextraction*) junto con el método de cromatografía de gases-espectroscopía de masas (GC-MS, del inglés *gas chromatography-mass spectroscopy*) ya que HS-SPME es una técnica efectiva, no costosa y respetuosa con el medio ambiente para la detección y cuantificación de compuestos volátiles^(16,17).

Hasta donde se sabe, esta técnica no ha sido utilizada para la detección de timol y carvacrol en una matriz orgánica adicionada con AEO, sino sólo para cuantificar estos compuestos activos en aceite puro⁽¹⁸⁻²⁰⁾. Este trabajo comparó una técnica de extracción con disolvente utilizando éter de petróleo o acetato de etilo en un extractor Soxhlet⁽²¹⁾ con una técnica HS-SPME de la matriz de harina de alimento para cerdo para cuantificar el timol y el carvacrol del extracto utilizando un sistema GC-MS. Se utilizó nitrosopiperidina (NPIP) como estándar interno para absorber las variaciones de señal debidas al método de extracción y al propio equipo⁽²²⁾ y calcular el límite de detección (LDD) y el límite de cuantificación (LDC) para evaluar la efectividad de la técnica de extracción. Finalmente, se realizó un diseño de experimentos utilizando el software R⁽²³⁾ y RStudio⁽²⁴⁾.

Material y métodos

Reactivos

El timol (100.0 %), el carvacrol (99.9 %), la nitrosopiperidina (99.9 %) y el cloruro de sodio se obtuvieron de Sigma Aldrich (St. Louis, EE. UU.). El éter de petróleo y el acetato de etilo de grado analítico (ACS) se obtuvieron de Fermont (Monterrey, México). Se utilizó agua tridestilada de MERCK en los experimentos de HS-SPME. El gas portador utilizado para GC-MS fue helio ultra alta pureza (grado 5.0) de Praxair. Las fibras de poliacrilato (PA) para SPME se obtuvieron de Sigma Aldrich. Una industria local proporcionó la harina de alimento para cerdo adicionada con AEO.

Método cromatográfico

Para la detección e identificación se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent modelo 7890A junto con un espectrómetro de masas modelo 5975C con un ion de polo positivo, un solo cuadrupolo con fuente de ionización por impacto electrónico (IE). Una columna capilar HP-INNOWax (30 m, 0.25 mm DI y película de polietilenglicol de 0.5 µm de grosor; Alltech) se utilizó para la separación de compuestos. La temperatura de la línea de transferencia se fijó en 250 °C y el puerto inyector GC en 260 °C en modo splitless. La temperatura del horno se fijó inicialmente en 60 °C durante 3 min, luego se elevó a 250 °C a una velocidad de 20 °C por minuto y se mantuvo allí durante 3 min. El MS se programó tanto en modo de escaneo como en modo SIM, con un tiempo de retardo de disolvente de 8 min. El modo de escaneo se estableció de 20 a 300 m/z, mientras que el modo SIM se estableció en 114 m/z (iones

característicos de nitrosopiperidina) durante el intervalo de tiempo de 8 a 11.5 min e inmediatamente se cambió para seguir las señales de 135 y 150 m/z (ion característico de timol y carvacrol) hasta el final del análisis.

Preparación de muestras

Una industria local proporcionó las muestras de harina de alimento para cerdo adicionado con aceite esencial de orégano durante el proceso de elaboración. Las muestras se almacenaron en bolsas de plástico herméticas hasta su uso. En este trabajo se utilizaron dos técnicas diferentes para extraer timol y carvacrol: (i) extracción con disolvente utilizando un aparato de destilación Soxhlet, y (ii) HS-SPME utilizando una fibra de PA. Se utilizaron tres disolventes diferentes: acetato de etilo y éter de petróleo para la extracción Soxhlet y agua desionizada para la técnica HS-SPME. Se agregaron 5.0 mg L⁻¹ de NPIP a cada muestra como estándar interno.

Extracción con disolvente Soxhlet

Se colocó una muestra de 10 g de alimento para cerdo en un aparato de extracción Soxhlet con 130 ml de disolvente (ya sea acetato de etilo o éter de petróleo). La mezcla se calentó hasta que se completaron cinco ciclos, luego se almacenó una alícuota de este extracto para su análisis. Inmediatamente se añadió un disolvente nuevo fresco para realizar otros cinco ciclos utilizando la misma muestra, y se tomó otra alícuota de extracto. Se realizó un tercer paso de destilación con más disolvente fresco, y se tomó una tercera alícuota. Así, cada muestra (10 g de alimento para cerdo) se sometió a extracción tres veces utilizando dos disolventes diferentes.

Además, se utilizaron dos métodos de cuantificación utilizando (a) una curva de calibración estándar externa y (b) un método de adición estándar. La curva de calibración para el estándar externo se realiza utilizando concentraciones conocidas para timol y carvacrol (2, 4, 6, 8 y 10 mg L⁻¹). Para el método de adición estándar, se mezclaron 0.5 ml de alícuota de extracto con 0.5 ml de disolvente con diferentes concentraciones de timol y carvacrol (2, 4, 6, 8 y 10 mg L⁻¹). En todos los casos, la cantidad de muestra inyectada en el GC fue de 1.0 µl.

Microextracción en fase sólida en el espacio de cabeza

La técnica HS-SPME involucra algunos parámetros como el tiempo de equilibrio (t_{eq}), la temperatura de equilibrio (T_{eq}), el tiempo de extracción (t_{ext}), la temperatura de extracción (T_{ext}) y la fuerza iónica (I). El tiempo y la temperatura de equilibrio son el tiempo y la temperatura a la que se deja que la muestra alcance el equilibrio entre la fase sólida (matriz de alimento para cerdo) y el espacio de cabeza del vial. El tiempo de extracción y la

temperatura de extracción corresponden al tiempo y la temperatura a la que la microfibras está en contacto con el espacio de cabeza que adsorbe compuestos volátiles. La fuerza iónica es una medida de la concentración de iones en una solución y modifica el equilibrio del sistema. Es necesario determinar el efecto de estos parámetros sobre la señal obtenida en GC-MS. Para evaluar este efecto, se agregaron estándares de timol y carvacrol en agua (junto con 5 mg L⁻¹ de NPIP como el estándar interno) para formar una solución de 10 mg L⁻¹.

Para la cuantificación de timol y carvacrol en alimento para cerdo, se agregó una muestra de 0.5 g de alimento en polvo para cerdo a viales de vidrio de 15 ml con septum de PTFE/silicona con el contenido requerido de NaCl y 10 ml de agua con diferentes concentraciones de timol y carvacrol para realizar el análisis de la técnica de adición estándar. Las curvas de calibración estándar externas no fueron posibles de realizar en el HS-SPME debido a las interacciones entre los compuestos volátiles de la matriz del alimento en polvo para cerdo en la fase gaseosa y la fibra durante la extracción. El área relativa entre timol o carvacrol y el estándar agregado (NPIP) se calculó y se utilizó como variable de respuesta para evaluar el rendimiento del método de extracción.

Diseño de experimentos

Se realizó un análisis factorial 2⁴ para evaluar el efecto de la temperatura de equilibrio (40-50 °C), la temperatura de extracción (40-50 °C), el tiempo de extracción (20-40 min) y la fuerza iónica (0.57-2.28 mol L⁻¹ de NaCl). El tiempo de equilibrio se fijó en un tiempo suficientemente largo para asegurar el equilibrio (Cuadro 1).

Cuadro 1: Valores de los niveles de los factores para el diseño del experimento

Factor	Nivel bajo -1	Nivel alto +1
Temperatura de equilibrio, T _{eq} (°C)	40	50
Temperatura de extracción, T _{ext} (°C)	40	50
Tiempo de extracción, t _{ext} (min)	20	40
Fuerza iónica, I (mole L ⁻¹)	0.57	2.28

Un diseño factorial de experimentos 2⁴ con una sola réplica consiste en 16 corridas experimentales. El análisis de varianzas del modelo completo (factores principales y todas las combinaciones de interacción posibles) no da residuales, F_o y valores P ya que el grado de libertad del error es igual a cero y no hay estimación del error interno. Por lo tanto, las interacciones insignificantes de tres y cuatro órdenes se utilizan para estimar el error. Además, después de evaluar el ANOVA de los efectos principales y las interacciones de dos factores, se definen los factores significativos y se realiza otro análisis ANOVA teniendo en

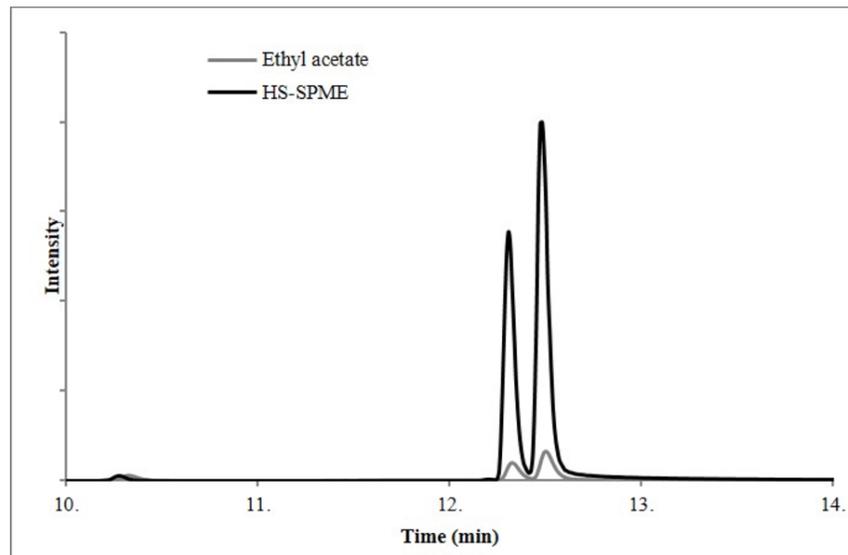
cuenta solo los factores que son significativos. A continuación, se evalúa un modelo de regresión y se trazan las gráficas de residuales y de contorno utilizando R-studio.

Resultados

Identificación del espectro de masas de timol y carvacrol

Se colocó una muestra de 0.5 g de alimento en polvo para cerdo en un vial con 10 ml de agua y NPIP como estándar interno. Se realizó un proceso HS-SPME para identificar la presencia de timol y carvacrol, como se muestra en la Figura 1. Los espectros del modo de escaneo se analizaron con la biblioteca de espectro de masas NUST/EPA/NIH para su confirmación con una concordancia del 90 % entre el espectro experimental y teórico. Los tiempos de retención del estándar interno, timol y carvacrol fueron de 10.3, 12.3 y 12.5 min, respectivamente. El tiempo de retención se obtiene siguiendo su respectivo ion característico: 144 para NPIP, 135 para timol y 150 para carvacrol. Es importante tener en cuenta que la columna HP-Innowax fue apropiada para una buena separación entre el timol y el carvacrol debido a su naturaleza isomérica.

Figura 1: Cromatogramas de alimento en polvo para cerdo utilizando acetato de etilo y HS-SPME



Curvas de calibración

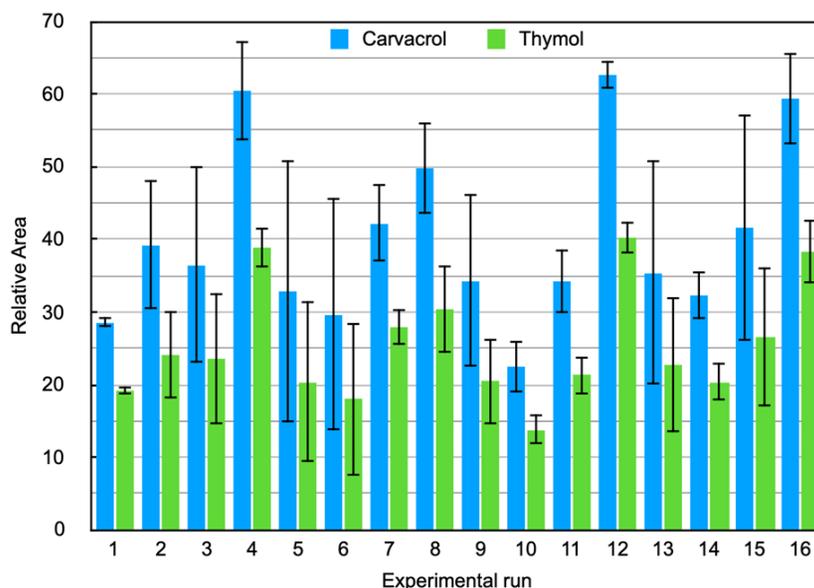
Para fines de comparación, se realizaron tres metodologías diferentes para la cuantificación de timol y carvacrol: (a) extracción Soxhlet utilizando disolventes orgánicos y calibración con un estándar externo, (b) extracción Soxhlet usando disolventes orgánicos y calibración por adición estándar, y (c) HS-SPME con agua como disolvente y calibración usando adición

estándar. El uso de un estándar externo y una adición estándar está destinado a la comparación de sensibilidad.

La Figura 1 muestra la comparación de cromatogramas SIM utilizando la extracción HS-SPME y Soxhlet con disolvente de acetato de etilo. Para la técnica HS-SPME, la sensibilidad aumenta casi nueve veces en comparación con la técnica de extracción con disolvente, incluso utilizando menos cantidad de muestra durante el proceso de microextracción, lo que demuestra la efectividad y ventaja de la metodología de HS-SPME.

La señal obtenida [área relativa = (área de timol o de carvacrol) / (área del estándar interno)] y su desviación estándar relativa (DER) para todos los experimentos del diseño factorial se muestra en la Figura 2. Hay siete experimentos con una DER <15 % para ambos analitos, pero solo dos con una DER <5.5 %, experimentos #1 y #12. Una señal alta es deseable, por lo que se identificaron cuatro experimentos con un área relativa alta. Los experimentos #4, #12 y #16 muestran una combinación de señal alta (área relativa) con valores de dispersión (DER) bajos. Todos estos experimentos se realizaron a un contenido de sal de 0.57 M y tiempo de extracción de 40 min, pero con temperatura de extracción y temperatura de equilibrio de 40 y 50 °C. Es interesante notar que la fuerza iónica (contenido de sal) y el tiempo de extracción son los factores en común, y son factores significativos como se observará más adelante.

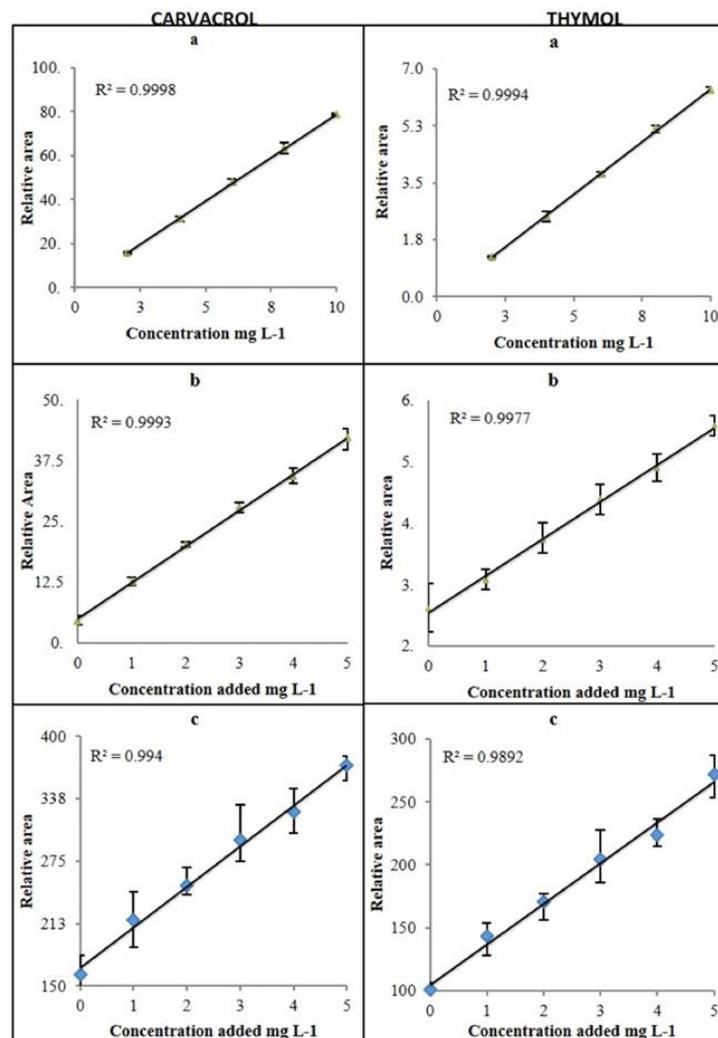
Figura 2: Área relativa y dispersiones (desviación estándar relativa) para timol y carvacrol para cada experimento del diseño factorial para mejorar los parámetros del proceso



En la Figura 3 se pueden observar las curvas de calibración para: (a) el uso de timol y carvacrol como estándares externos para la técnica de extracción Soxhlet; (b) el uso de NPIP

como estándar añadido para la técnica de extracción Soxhlet; y (c) el uso de NPIP como estándar añadido para la técnica HS-SPME. No es posible utilizar estándares externos para la técnica SPME. Cabe destacar que la señal del área relativa es del orden de decenas para el carvacrol, ya sea con estándar externo o estándar de adición, mientras que la señal del área relativa para el timol está en el orden de unidades para estándares externos y de adición. Pero para HS-SPME la señal del área relativa es del orden de cientos tanto para el timol como para el carvacrol, lo que confirma nuevamente el aumento de la sensibilidad de un orden de magnitud (dos órdenes para el timol) de esta técnica.

Figura 3: Curvas de calibración de estándares externos de extracción Soxhlet (a), extracción Soxhlet con curvas de adición estándar (b) y HS-SPME con curvas de adición estándar (c), para cuantificación de carvacrol y timol



Los valores del área relativa (eje y) son mayores para la técnica HS-SPME en comparación con la técnica de extracción Soxhlet. Extracción Soxhlet utilizando acetato de etilo y HS-SPME utilizando agua como disolventes.

Discusión

Diseño de experimentos

El Cuadro 2 muestra el análisis de varianza para los efectos principales y las interacciones de dos factores para la cuantificación de carvacrol y timol, y es posible observar que solo el tiempo de extracción y el contenido de sal, así como la interacción entre ellos, son significativos para ambos analitos. El Cuadro 3 muestra el análisis de varianza considerando solo los factores de fuerza iónica, el tiempo de extracción y la interacción fuerza iónica-tiempo de extracción para carvacrol y timol. Considerando sólo los factores e interacciones significativas, el modelo de regresión para la extracción HS-SPME de carvacrol es:

$$\text{CarvacrolAreaRel} = 13.9782 + 9.0768 I + 1.3297 \text{ text} - 0.6242 I \times \text{text}$$

Con un R^2 de 0.8558, que significa que el 85.6 % de la variabilidad de los datos se explica por el modelo con una gráfica de residuos distribuidos aleatoriamente (no se muestra). Una gráfica de contorno en la Figura 4 muestra que cuando el tiempo de extracción está en un nivel alto, hay un fuerte efecto negativo del contenido de sal, lo que significa que el área relativa de carvacrol es mayor cuando el contenido de sal es menor; además, cuando el tiempo de extracción está en un nivel bajo, todavía hay un efecto negativo del contenido de sal, pero más débil que en el nivel alto del tiempo de extracción. Considerando sólo los factores e interacciones significativas, el modelo de regresión para la extracción HS-SPME de timol es:

$$\text{TimolAreaRel} = 9.5790 + 5.5841 I + 0.8329 \text{ text} - 0.4008 I \times \text{text}$$

Con un R^2 de 0.8401, que significa que el 84 % de la variabilidad de los datos se explica por el modelo con una gráfica de residuos distribuidos aleatoriamente (no se muestra). Una gráfica de contorno en la Figura 5 muestra que cuando el tiempo de extracción está en un nivel alto, hay un fuerte efecto negativo del contenido de sal, lo que significa que el área relativa de timol es mayor cuando el contenido de sal es menor; además, cuando el tiempo de extracción está en un nivel bajo, todavía hay un efecto negativo del contenido de sal, pero más débil que en el nivel alto de tiempo de extracción. Esto es lo mismo para el timol y el carvacrol, la única diferencia es que el carvacrol muestra una señal del área relativa 1.5 veces mayor que el timol.

Cuadro 2: ANOVA de los efectos principales e interacciones de dos factores para el diseño del experimento

	Carvacrol					Timol				
	GL	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F ₀	Valor P	GL	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F ₀	Valor P
T _{eq} (°C)	1	0.6	0.6	0.016	0.90550	1	0.2	0.2	0.011	0.92026
T _{ext} (°C)	1	1.4	1.4	0.038	0.85218	1	0.7	0.7	0.042	0.84494
I (M)	1	1089.2	1089.2	29.208	0.00293	1	484.9	484.9	30.822	0.00261
t _{ext} (min)	1	310.1	310.1	8.315	0.03444	1	109.7	109.7	6.974	0.04593
T _{eq} x T _{ext}	1	39.0	39.0	1.046	0.35339	1	28.3	28.3	1.798	0.23760
T _{eq} x I	1	13.7	13.7	0.368	0.57070	1	6.6	6.6	0.416	0.54715
T _{eq} x t _{ext}	1	3.6	3.6	0.096	0.76966	1	0.1	0.1	0.006	0.94100
T _{ext} x I	1	2.8	2.8	0.075	0.79541	1	1.4	1.4	0.089	0.77805
T _{ext} x t _{ext}	1	65.0	65.0	1.742	0.24407	1	33.1	33.1	2.105	0.20652
t _{ext} x I	1	455.8	455.8	12.222	0.01736	1	187.9	187.9	11.941	0.01813
Residuos	5	186.5	37.3			5	78.7	15.7		

GL= grados de libertad.

El Cuadro 3 muestra el análisis de la varianza evaluado solo con los factores significativos del DOE, es decir, los factores de fuerza iónica, tiempo de extracción e interacción fuerza iónica-tiempo de extracción.

Cuadro 3: ANOVA de los factores significativos para el diseño de experimento

	Carvacrol					Timol				
	GL	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F ₀	Valor P	GL	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F ₀	Valor P
I (M)	1	1089.2	1089.2	41.83	<0.001	1	484.9	484.9	39.065	<0.001
t _{ext} (min)	1	310.1	310.1	11.91	0.00480	1	109.7	109.7	8.839	0.01163
t _{ext} x I	1	455.8	455.8	17.50	0.00127	1	187.9	187.9	15.134	0.00215
Residuos	12	312.5	26.0			12	148.9	12.4		

GL= grados de libertad.

Para elegir los mejores parámetros operativos, siempre se deben seleccionar un tiempo de extracción alto y un contenido de sal bajo. Dado que los otros dos factores no son significativos, se puede trabajar a cualquier temperatura de equilibrio y temperatura de extracción; por lo tanto, se decidió trabajar a bajas temperaturas de equilibrio y extracción por razones económicas.

Cuadro 4: Cuadro de efectos para el diseño del experimento

	Carvacrol			Timol		
	Efecto	Valor T	Valor P	Efecto	Valor T	Valor P
Fuerza iónica, M	-16.502	-6.467	<0.001	-11.0102	-6.250	<0.001
Tiempo de extracción, min	8.804	3.451	0.00480	5.2372	2.973	0.01163
$t_{\text{ext}} \times I$	-10.674	-4.183	0.00127	-6.853	-3.890	0.00215

Para ambos analitos, un aumento en el contenido de sal (o fuerza iónica) resulta en una disminución en el área relativa, probablemente porque la solución está cerca de la saturación. Además, un tiempo de extracción alto (t_{ext}) beneficia la señal del área relativa lo que está en buen acuerdo con el concepto de que la extracción aumenta a medida que aumenta el tiempo de extracción.

El Cuadro 5 muestra el contenido de timol y carvacrol en el alimento en polvo para cerdo al comparar las dos técnicas de extracción y los disolventes utilizados. El contenido total de timol y carvacrol para cada disolvente se calcula sumando la cantidad medida de cada una de las tres extracciones consecutivas. En cuanto a la extracción con disolvente Soxhlet, el éter de petróleo no fue eficiente en la extracción de timol y carvacrol del alimento en polvo para cerdo, como lo indica la baja cuantificación obtenida de ambos componentes, pero especialmente para el timol. El éter de petróleo extrajo de 52 a 55 % menos de timol y de 19 a 22 % menos de carvacrol que el acetato de etilo. Curiosamente, existe una capacidad de extracción selectiva de ambos disolventes para el timol sobre el carvacrol. Una vez más, la técnica HS-SPME muestra una capacidad de extracción mejorada tanto para el timol como para el carvacrol, y se extraen sin selectividad.

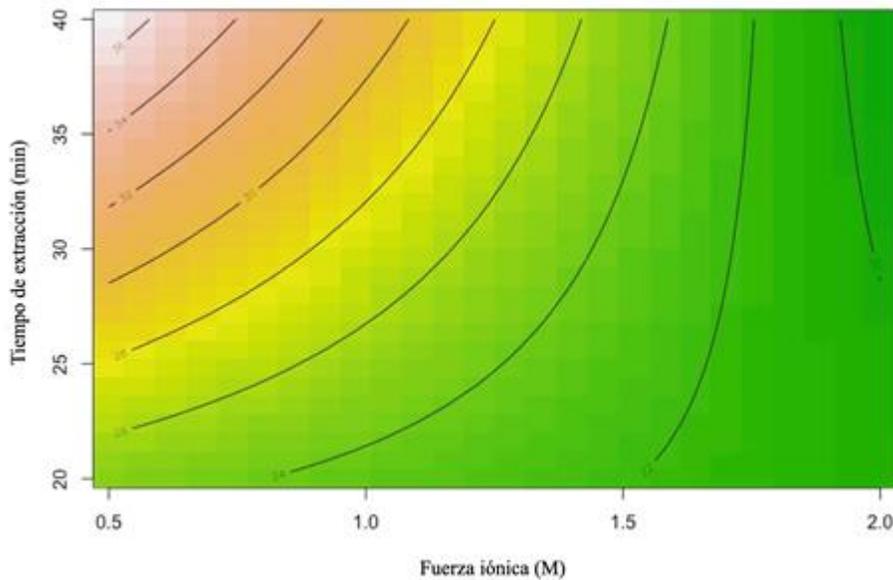
Cuadro 5: Comparación del contenido total de timol y carvacrol en alimento concentrado para cerdo medido por diferentes técnicas de extracción

Técnica	Extracción Soxhlet						HS-SPME			
Método estándar	Adición estándar				Estándar externo				Adición estándar	
Disolvente	Acetato de etilo		Éter de petróleo		Acetato de etilo		Éter de petróleo		Agua	
Analito	Timol	Carvacrol	Timol	Carvacrol	Timol	Carvacrol	Timol	Carvacrol	Timol	Carvacrol
Primer extracto, mg L ⁻¹	4.25	0.67	1.99	0.48	4.03	0.58	1.92	0.40	-	-

Segundo extracto, mg L ⁻¹	0.63	0.16	0.33	0.18	0.79	0.15	0.24	0.16	-	-
Contenido total, mg L ⁻¹	4.88	0.82	2.32	0.67	4.82	0.73	2.16	0.56	3.25	4.17
Contenido en alimento para cerdo, mg kg ⁻¹	63.45	10.71	30.22	8.66	62.60	9.43	28.12	7.30	65.00	83.40

El método de calibración también muestra algunas diferencias. La calibración con un estándar externo muestra un valor de concentración que es 9 % menor en promedio que el que utiliza la calibración de adición estándar; el método de adición estándar tiene una incertidumbre mejorada, pero es un método costoso ya que el estándar debe agregarse a cada muestra.

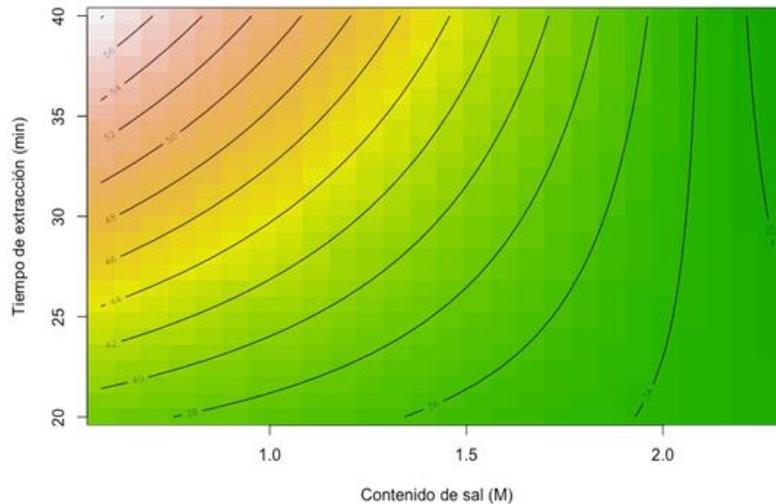
Figura 4: Gráfico de contorno para la resistencia iónica y el tiempo de extracción para la extracción de carvacrol utilizando HS-SPME



La técnica HS-SPME muestra la mayor concentración de timol y carvacrol. El contenido total de timol concuerda con el contenido total de timol obtenido por extracción Soxhlet con acetato de etilo de aproximadamente 63-65 mg/kg; sin embargo, el contenido total de carvacrol es muy diferente. La cuantificación de carvacrol por HS-SPME tiene un valor de 83.40 mg/kg, mientras que la cuantificación utilizando extracción Soxhlet con acetato de etilo

es de 10.71 mg/kg, que es ocho veces menor que el resultado de HS-SPME. Esto podría estar relacionado con el comportamiento estérico del timol y el carvacrol (estereoisómeros) y las interacciones con el material de fibra (poliacrilato).

Figura 5: Diagrama de contorno para la resistencia iónica y el tiempo de extracción para la extracción de timol utilizando HS-SPME



Validación de métodos

Los límites de detección (LDD) y cuantificación (LDC) se estimaron para evaluar el rendimiento de los métodos de extracción y se calcularon utilizando el ruido y la señal de referencia, definidos como tres veces la relación señal/ruido para LDD y diez veces para el LDC⁽¹⁶⁾. La Figura 3 muestra las curvas de calibración para cada componente (timol y carvacrol) para los tres diferentes disolventes utilizados. Los valores de LDD y LDC utilizando la extracción Soxhlet con acetato de etilo fueron de 3.7 y 12.5 μl^{-1} para el timol y 1.4 y 4.7 $\mu\text{g L}^{-1}$ para el carvacrol, respectivamente. La técnica HS-SPME da mejores resultados para ambas sustancias ya que los valores de LDD y LDC fueron de 0.9 y 3.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ para el timol y 0.6 y 1.9 $\mu\text{g L}^{-1}$ para el carvacrol, respectivamente. La linealidad de los datos se estimó a través del coeficiente de correlación lineal, donde el valor más bajo encontrado fue 0.9892.

Conclusiones e implicaciones

El aceite esencial de orégano se identifica positivamente en el alimento concentrado para cerdo utilizando compuestos volátiles característicos timol y carvacrol utilizando dos métodos de extracción diferentes: Soxhlet y HS-SPME. Entre los disolventes orgánicos para

la extracción Soxhlet, el éter de petróleo no fue adecuado ya que solo extrajo alrededor del 50 y el 10 % del contenido total de timol y carvacrol, respectivamente (en relación con la cuantificación de HS-SPME). Además, en cuanto al uso de acetato de etilo en la extracción Soxhlet, este disolvente fue capaz de extraer todo el timol, pero no el carvacrol, mostrando algún tipo de selectividad. Para la técnica HS-SPME, se realizó un diseño factorial de experimentos 2^4 para evaluar los parámetros del proceso y obtener la mayor relación S/N posible. Las condiciones adecuadas son temperatura de equilibrio (T_{eq}) de 40 °C, temperatura de extracción (T_{ext}) de 40 °C, fuerza iónica (I) de 0.57 M y tiempo de extracción (t_{ext}) de 40 min. HS-SPME mostró un rendimiento de extracción nueve veces mejor en comparación con la extracción Soxhlet, incluso con cantidades de muestra más pequeñas, con un límite de detección y cuantificación de 0.9 y 3.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ para timol, y 0.6 y 1.9 $\mu\text{g L}^{-1}$ para carvacrol, respectivamente. Los resultados muestran que el método HS-SPME es más eficiente para la extracción de timol y carvacrol de una matriz orgánica y tiene el potencial de una técnica de control de calidad en la industria alimentaria para cuantificar los compuestos activos del aceite esencial de orégano cuando se utiliza como aditivo para una matriz orgánica como el alimento para cerdo.

Agradecimientos

Al CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) por el apoyo financiero otorgado al doctorando Fernando Jonathan Lona Ramírez (número de beca: 344837) y al Tecnológico Nacional de México (TecNM) por la beca de investigación número 5267.14-P para la realización de este estudio. A Alimentos Aicansa SA por proporcionar muestras de alimento para cerdo con AEO como aditivo.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Literatura citada:

1. Sánchez-Ruíz JF, Tejeda-Rosales ME, Sánchez-Tejeda JF, Sánchez-Tejeda MG. Pharmacy, medicine and herbology in the Florentine Codex. Rev Mex Cienc Farm 2012;43(3):55-66.
2. Kintzios SE. Oregano. In: Peter KV editor. Handbook of herbs and spices Vol. 2. Cambridge, UK: Woodhead; 2004:215-229.
3. Ahmad A, Khan A, Akhtar F, Yousuf S, Xess I, Khan LA, Manzoor N. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against Candida. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2011;30(1):41-50.

4. Liolios CC, Gortzi O, Lalas S, Tsaknis J, Chinou I. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and *in vitro* antimicrobial activity. Food Chem 2009;112(1):77-83.
5. Marchese A, Orhan IE., Daglia M, Barbieri R, Di Lorenzo A, Nabavi SF, Gortzi O, Izadi M, Nabavi SM. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. Food Chem 2016;210:402-414.
6. Pesavento G, Calonico C, Bilia AR, Barnabei M, Calesini F, Addona R, *et al.* Antibacterial activity of Oregano, *Rosma-rinus* and *Thymus essential* oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. Food Control 2015;54:188-199.
7. Bozkurt M, Bintaş E, Kırkan Ş, Akşit H, Küçükylmaz K, Erbaş G, *et al.* Comparative evaluation of dietary supplementation with mannan oligosaccharide and oregano essential oil in forced molted and fully fed laying hens between 82 and 106 weeks of age. Poult Sci 2016;95(11):2576-2591.
8. Franciosini MP, Casagrande-Proietti P, Forte C, Beghelli D, Acuti G, Zanichelli D, *et al.* Effects of oregano (*Origanum vulgare* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) aqueous extracts on broiler performance, immune function and intestinal microbial population. J Appl Anim Res 2016;44(1):474-479.
9. Scocco P, Forte C, Franciosini MP, Mercati F, Casagrande-Proietti P, Dall'Aglio C, *et al.* Gut complex carbohydrates and intestinal microflora in broiler chickens fed with oregano (*Origanum vulgare* L.) aqueous extract and vitamin E. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl) 2017;101(4):676-684.
10. Zeng Z, Zhang S, Wang H, Piao X. Essential oil and aromatic plants as feed additives in non-ruminant nutrition: a review. J Anim Sci Biotechnol 2015;6:7.
11. Russo M, Galletti GC, Bocchini P, Carnacini A. Essential oil chemical composition of wild populations of italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart): A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. 1. Inflorescences. J Agric Food Chem 1998;46(9):3741-3746.
12. de Oliveira Nóbrega R, de Castro Teixeira, AP, Araújo de Oliveira W, de Oliveira Lima E, Oliveira Lima I. Investigation of the antifungal activity of carvacrol against strains of *Cryptococcus neoformans*. Pharm Biol 2016;54(11):2591-2596.
13. Safaei-Ghomi J, Ebrahimabadi AH, Djafari-Bidgoli Z, Batooli H. GC/MS analysis and *in vitro* antioxidant activity of essential oil and methanol extracts of *Thymus caramanicus* Jalas and its main constituent carvacrol. Food Chem 2009;115(4):1524-1528.

14. Díaz-Maroto MC, Pérez-Coello MS, Cabezudo MD. Supercritical carbon dioxide extraction of volatiles from spices: Comparison with simultaneous distillation–extraction. *J Chromatogr A* 2001;947(1):23-29.
15. Hossain MB, Barry-Ryan C, Martin-Diana AB, Brunton NP. Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) using response surface methodology. *Food Chem* 2011;126(1):339-346.
16. Lona-Ramirez FJ, Gonzalez-Alatorre G, Rico-Ramírez V, Perez-Perez, MCI, Castrejón-González EO. Gas chromatography/mass spectrometry for the determination of nitrosamines in red wine. *Food Chem* 2016;196:1131-1136.
17. Méndez-Pérez D, González Alatorre G, Botello Álvarez E, Escamilla Silva E, Alvarado JFJ. Solid-phase microextraction of N-nitrosodimethylamine in beer. *Food Chem* 2008; 107(3):1348-1352.
18. Adams A, Kruma Z, Verhé R, De Kimpe N, Kreichbergs V. Volatile profiles of rapeseed oil flavored with basil, oregano, and thyme as a function of flavoring conditions. *J Am Oil Chem Soc* 2011;88(2):201-212.
19. Karami-Osboo R, Miri R, Asadollahi M, Jassbi AR. Comparison between head-space spme and hydrodistillation-gc-ms of the volatiles of *Thymus daenensis*. *J Essent Oil Bear PI* 2015;18(4):925-930.
20. Stashenko EE, Martínez JR. Sampling volatile compounds from natural products with headspace/solid-phase micro-extraction. *J Biochem Biophys Methods* 2007;70(2):235-242.
21. Pothier J, Galand N, El Ouali M, Viel C. Comparison of planar chromatographic methods (TLC, OPLC, AMD) applied to essential oils of wild thyme and seven chemotypes of thyme. *II Farmaco* 2001;56(5-7):505-511.
22. Pawliszyn J. Solid phase microextraction: Theory and practice. New York, USA: Wiley-VCH; 1997.
23. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2021. <http://www.R-project.org/>
24. RStudio Team. RStudio: Integrated Development Environment for R. Boston, Massachusetts, USA: RStudio. PBC; 2020. <http://www.rstudio.com/>