

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas

“Implementación de un método *in vitro* para determinar la capacidad antioxidante de *Origanum vulgare* (Orégano) y *Thymus vulgaris* (Tomillo) mediante el blanqueamiento de carotenoides en microplacas”

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Ingeniero Químico

Presentado por:

María José Maldonado Estupiñan

Damon Jeremy Vera Murillo

Tutor(a):

Patricia Manzano Santana, PhD

Co-tutor (a):

QF. Glenda Piloza Muentes

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2022

DEDICATORIA

Dedico el presente proyecto a mis padres Magali Murillo y Rafael Vera, por apoyarme incondicionalmente en toda mi formación académica.

A mis hermanos, Laila y Adrián Vera, por estar siempre conmigo.

A mi Jaime Garcés, por confiar absolutamente en mis capacidades y alentarme a seguir adelante.

Finalmente, dedico este trabajo a mi tío José Murillo y mi abuela Juana Cabello, quienes estuvieran orgullosos de verme culminar esta etapa en mi vida.

Damon Vera Murillo

Llena de amor, esperanza y regocijo, dedico este proyecto a mis padres Cathy Estupiñan y Miguel Maldonado, quienes han sido mis pilares fundamentales, la motivación y el orgullo de mi vida.

A mi hermano Jhon, por estar en todas y cada una de las etapas de mi vida, y celebrar todos mis logros haciéndolos suyos.

A mi abuelo Domingo Estupiñan, por brindarme su apoyo incondicional, aconsejarme y hacer de mí una mejor persona.

María Maldonado

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por ser nuestra luz, apoyo y camino, por brindarnos su amor y fortaleza a nuestras almas para permitirnos llegar a estas instancias de mi vida.

A nuestros padres, hermanos y abuelos, quienes han sido la motivación de nuestras vidas y permitirnos ser parte de su orgullo.

A los profesores de la carrera Ingeniería Química, verdaderos maestros y forjadores de profesionales excelentes. Al personal del Laboratorio de Bioproductos del CIBE, por su colaboración.

A nuestras tutoras Patricia Manzano y Glenda Piloza por confiar en nosotros y brindar su apoyo absoluto durante la ejecución del proyecto,

Sin dejar atrás, a todos nuestros familiares y amigos, quienes con su apoyo y palabras de aliento nos han motivado a culminar esta gran etapa de nuestras vidas.

Finalmente, nos gustaría citar la frase con la que nos identificamos: “Soy tan artista que puedo dibujar de mi imaginación. El conocimiento es limitado, la imaginación envuelve al mundo”

Albert Einstein

Maria Maldonado y Damon Vera

DECLARACIÓN EXPRESA

"Los derechos de titularidad y explotación, nos corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; (*María José Maldonado Estupiñan y Damon Jeremy Vera Murillo*) y damos nuestro consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual"

María J. Maldonado

María José Maldonado
Estupiñan

Damon Jeremy Vera

Damon Jeremy Vera
Murillo

EVALUADORES

NADIA
MAGALY
FLORES
MANRIQUE

Firmado
digitalmente por
NADIA MAGALY
FLORES MANRIQUE
Fecha: 2022.10.08
18:07:42 -05'00'

Nadia Flores Manrique

PROFESOR DE LA MATERIA

Patricia
Manzano
Santana

Firmado digitalmente
por Patricia Manzano
Santana
Fecha: 2022.10.07
12:11:05 -07'00'

Patricia Manzano Santana

PROFESOR TUTOR



Firmado electrónicamente por:
GLENDA MARGARITA
PILOZO MIENTES

Glenda Piloza Muentes

PROFESOR CO-TUTOR

RESUMEN

El presente tubo la finalidad de proponer posibles alternativas naturales que permitan reemplazar antioxidantes sintéticos en la industria alimentaria en un futuro. Se implementó un método *in vitro* para determinar la actividad antioxidante de especies vegetales como *Origanum vulgare* (orégano) y *Thymus vulgaris* (tomillo) mediante el blanqueamiento de carotenoides en microplacas. La propuesta se desarrolló a partir de la revisión bibliográfica para la selección de especies, posteriormente se realizó la extracción de los aceites esenciales por destilación mediante arrastre de vapor. Luego, se efectuó la estandarización previa en la determinación de actividad antioxidante para establecer las condiciones óptimas de la técnica. Se realizó un barrido espectral y un análisis de la cinética de la reacción con las diferentes muestras y controles, para establecer la longitud de onda y el tiempo de incubación para lograr la degradación completa del control negativo. Los resultados revelaron que el aceite esencial del tomillo presentó mayor actividad antioxidante (IC_{50} 21.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en comparación al BHT (IC_{50} 51.59 $\mu\text{g}/\text{ml}$), los cuales fueron corroborados mediante un análisis de varianza y prueba de Tukey. También, se observó que los valores obtenidos son superiores en relación con las referencias bibliográficas, debido a los factores fisicoquímicos que intervienen en la ejecución del método. El trabajo presentado proporciona valiosa evidencia *in vitro* con respecto a la aplicación potencial de aceites esenciales de especies cultivadas en Ecuador, pero no son aprovechadas como agentes antioxidantes en la industria alimentaria.

Palabras Clave: Actividad antioxidante, aceite esencial, blanqueamiento de carotenoides, *in vitro*.

ABSTRACT

*The present study aims to propose possible natural alternatives to replace synthetic antioxidants in the food industry in the future. An in vitro method was implemented to determine the antioxidant activity of plant species such as *Origanum vulgare* (oregano) and *Thymus vulgaris* (thyme) by bleaching carotenoids in microplates. The proposal was developed from the bibliographic review for the selection of species, then the extraction of essential oils by steam distillation was carried out. Then, the previous standardization was made in the determination of antioxidant activity to establish the optimal conditions of the technique. A spectral scan and reaction kinetics analysis was performed with the different samples and controls to establish the wavelength and incubation time to achieve complete degradation of the negative control. The results revealed that the essential oil of thyme presented greater antioxidant activity (IC50 21.01 $\mu\text{g/mL}$) compared to BHT (IC50 51.59 $\mu\text{g/mL}$), which were corroborated by an analysis of variance and Tukey test. It was also observed that the values obtained are higher in relation to the bibliographical references, due to the physico-chemical factors involved in the implementation of the method. The presented work provides valuable in vitro evidence regarding the potential application of essential oils from species that are harvested in Ecuador but are not exploited as antioxidant agents in the food industry.*

Keywords: Antioxidant activity, essential oil, carotenoid whitening, in vitro.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	I
<i>ABSTRACT</i>	II
ÍNDICE GENERAL	III
ABREVIATURAS	VI
SIMBOLOGÍA	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
1. Introducción	10
1.1 Descripción del problema	10
1.2 Justificación del problema	11
1.3 Objetivos	12
1.3.1 Objetivo General	12
1.3.2 Objetivos Específicos	12
1.4 Marco teórico	12
1.4.1 Aceites esenciales	12
1.4.2 Antioxidantes	16
1.4.3 Carotenoides	16
1.4.4 Blanqueamiento de B-caroteno	20
1.4.5 Microplacas	22
1.4.6 Lector de microplacas	23
2. Metodología	24
2.1 Selección de especies	24
2.2 Recolección de especies	24
2.3 Secado de especies	25
2.3.1 Orégano	25

2.3.2	Tomillo	25
2.4	Obtención de aceites esenciales	26
2.4.1	Método de extracción	26
2.4.2	Aceite esencial de Orégano	27
2.4.3	Aceite esencial de Tomillo.....	27
2.4.4	Purificación de muestras de aceite.....	28
2.5	Estandarización previa al método para la determinación de Actividad Antioxidante	28
2.5.1	Determinación de la Actividad Antioxidante.....	29
2.6	Representación de resultados	32
2.6.1	Actividad antioxidante	32
2.6.2	IC ₅₀	32
2.7	Análisis Estadístico.....	33
3.	Resultados Y ANÁLISIS	35
3.1	Obtención de aceites esenciales	35
3.2	Rendimiento de la extracción de aceites esenciales.....	36
3.3	Estandarización previa a la determinación de actividad antioxidante.....	38
3.3.1	Barrido espectral	38
3.3.2	Cinética de la reacción	39
3.4	Actividad antioxidante.....	41
3.4.1	IC ₅₀	43
3.5	Análisis ANOVA.....	45
3.6	Análisis económico.....	47
3.6.1	Producción de aceite esencial.....	47
4.	Conclusiones Y Recomendaciones.....	50
4.1	Conclusiones	50
4.2	Recomendaciones.....	51

BIBLIOGRAFÍA	52
APÉNDICE A.....	59
A.1 Ecuación de rendimiento de aceites esenciales	59
APÉNDICE B.....	60
B.1 Concentraciones y absorbancia del Estándar BHT y aceites esenciales a 0 min 60	
B.2 Lectura de absorbancia por triplicado del blanco y control negativo a 0 min	60
B.3 Concentraciones y absorbancia del Estándar BHT y aceites esenciales a 60 min 60	
B.4 Lectura de absorbancia por triplicado del blanco y control negativo a 60 min ..	60
APÉNDICE C	61
C.1 Gráficas para el Cálculo del IC50 de Tomillo	61
C.2 Gráficas para el Cálculo del IC50 de BTH.....	62
APÉNDICE D	63
D.1 Análisis de varianza de las muestras	63
D.2 Resumen (ANOVA).....	63
D.3 Análisis de datos (ANOVA)	63
D.4 Variables de Método Tukey	64
D.5 Cuantiles de la distribución de Tukey $q(n,m)$	64

ABREVIATURAS

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
MAAE	Ministerio de Ambiente, Agua y Transición Ecológica
CIBE	Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador
FCNM	Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas.
DPPH•	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
ABTS• ⁺	2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
BHT	Butilhidroxitolueno
BHA	Butilhidroxianisol
HLB	Hydrophile-Lipophile-Balance
DCM	Metanol
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sodio
ANOVA	Análisis de Varianzas

SIMBOLOGÍA

mL	Mililitro
mg	Miligramo
pH	Potencial de Hidrógeno
m	Metro
h	Hora
ppm	Partes por millón
%p/p	Porcentaje Peso a Peso
nm	Nanómetros
min	Minutos
µl	Microlitro
λ	Longitud de onda
°C	Grados Celsius
AE	Aceite Esencial
In	Logatirmo natural
%AA	Porcentaje de actividad antioxidante
Conc.	Concentración
R _{control}	Tasa de blanqueamiento del control negativo
R _{muestra}	Tasa de blanqueamiento de las muestras
A _{em}	Absorbancia en tiempo cero
A _{mt}	Absorbancia en tiempo t
Control +	Control positivo
Control -	Control negativo
HT	Hoja-Tallo
t	Tiempo

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 <i>Origanum vulgare</i>	13
Figura 1.2 Estructura química de los principales componentes en orégano	14
Figura 1.3 Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>).....	15
Figura 1.4 Estructura química de p-cimeno, timol y carvacrol.....	15
Figura 1.5 Principales estructuras de los carotenoides	19
Figura 1.6 Microplaca de 96 pocillos.....	23
Figura 2.1 Tendido de <i>O. vulgare</i>	25
Figura 2.2 Secado de <i>T. vulgaris</i>	26
Figura 2.3 Emulsión de coloración traslucida amarilla	29
Figura 3.1 Barrido espectral de aceites de las especies, blanco y control positivo. ..	39
Figura 3.2 Cinética de la reacción (BHT y Control -).....	40
Figura 3.3 %AA BHT vs LN conc (ppm).....	44
Figura 3.4 %AA Tomillo vs LN conc (ppm)	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Tipo de caroteno y presencia natural	17
Tabla 1.2 Principales tensoactivos con su respectivo índice HLB.....	21
Tabla 2.1 Selección de las especies.....	24
Tabla 2.2 Recolección de especies	25
Tabla 2.3 Cantidad de orégano empleado por ciclo.....	27
Tabla 2.4 Cantidad de tomillo empleado por ciclo	28
Tabla 2.5 Concentración de las disoluciones de los aceites y BHT	30
Tabla 2.6 Distribución de disoluciones en µl de blanco, control negativo, control positivo y aceites esenciales en la microplaca.....	31
Tabla 2.7 Estructura de ANOVA	33
Tabla 2.8 Análisis método de Tukey	34
Tabla 3.1 Resultados de destilación de aceites esenciales	35
Tabla 3.2 Densidad e índice de refracción de cada especie	36
Tabla 3.3 Rendimientos del proyecto vs Rendimientos bibliográficos.....	37
Tabla 3.4 Características organolépticas de los aceites esenciales de cada especie.....	38
Tabla 3.5 Actividad antioxidante de aceites esenciales y BHT	41
Tabla 3.6 Actividad antioxidante del proyecto vs Actividad antioxidante bibliográfica.....	43
Tabla 3.7 IC ₅₀ de BHT y <i>T. vulgaris</i>	44
Tabla 3.8 Actividades antioxidantes de las especies analizadas	45
Tabla 3.9 Variables útiles para análisis ANOVA	46
Tabla 3.10 Valor Crítico y p-valor	46
Tabla 3.11 Método de Tukey	46
Tabla 3.12 Costo de proceso de extracción de aceite	48
Tabla 3.13 Costo de materia prima y consumo de agua para 4.7 ml de producción ..	48
Tabla 3.14 Costo de producción para 5 mL de aceite esencial	48

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Descripción del problema

En las últimas tres décadas se viene desarrollando un mayor interés por problemas relacionados con el estrés oxidativo, radicales libres, especies reactivas del oxígeno y antioxidantes. Varios estudios evidencian una relación entre la patogénesis de un sin número de enfermedades degenerativas y envejecimiento celular y el efecto negativo que ejercen los radicales libres como generadores de estrés oxidativo (Crescenti, 2020).

Frente a esta gran problemática, la industria farmacéutica, alimenticia y cosmetológica, han utilizado antioxidantes sintéticos como el BHT (ButilHidroxiTolueno) y BHA (Butilhidroxianisol) para evitar la degradación del producto final. Sin embargo, se ha comprobado que niveles altos de los antioxidantes sintéticos producen alteraciones en algunos órganos, como los pulmones, hígado y corazón (Branen, 1975). Por lo tanto, grandes potencias como Estados Unidos y Japón han limitado e incluso prohibido su uso como aditivos en alimentos (González, 2013).

Actualmente, ha surgido una gran tendencia a sustituirlos por antioxidantes naturales debido a la creencia de que los compuestos naturales son más seguros que los compuestos sintéticos y, por consiguiente, son comercialmente más aceptados (Dorman & Hiltunen, 2004). Se ha demostrado que el consumo de compuestos antioxidantes presentes en alimentos naturales de origen vegetal disminuye el riesgo en desórdenes en la salud y esto es gracias, a sus actividades antioxidantes (Coronado et al., 2015).

Además, gran parte de las especies vegetales como plantas medicinales y aromáticas en Ecuador poseen compuestos activos como alcaloides y compuestos polifenólicos como flavonoides, estos presentan propiedades antibacterianas, antifúngicas y antioxidantes (Frankel, 1997). Por esta razón, ha incrementado el interés científico por analizar las propiedades antioxidantes de las plantas medicinales poco estudiadas (Soler, 2009).

Existen varios ensayos *in vitro* que se han desarrollado para medir la actividad antioxidante; entre estos predominan los que se basan en transferencia de electrones como son DPPH•, ABTS•+ y FRAP. Estos métodos espectrofotométricos difieren en cuanto al agente oxidante, el sustrato empleado, la técnica instrumental realizada y las interacciones de la muestra con el medio de reacción (Prez et al., 2000). No obstante, estudios recientes han revelado que estos métodos presentan baja reproducibilidad debido a factores físicos y químicos, tales como la temperatura, pH y solventes (Prieto et al., 2012). Por tanto, los métodos basados en transferencia de átomos de hidrogeno, como el blanqueamiento del β -caroteno han demostrado ser más relevantes y efectivos, debido a que se promueven el uso de especies vegetales con alto poder antioxidante en carotenoides (Magalhães et al., 2008).

1.2 Justificación del problema

Los antioxidantes naturales o sintéticos son sustancias empleadas para evitar la oxidación de grasas y aceites, presentes en concentraciones moderadas en los alimentos consumidos a diario. Dado las consecuencias que generan un impacto negativo en la salud de los seres vivos se ha restringido el uso de antioxidantes sintéticos en las industrias (González, 2013).

En la actualidad, el uso de antioxidantes naturales es una tendencia que permite sustituir aditivos sintéticos y garantiza baja toxicidad. En ese contexto, se ha escogido el aceite esencial de *Origanum vulgare* (Orégano) y *Thymus vulgaris* (Tomillo) como precursores de poder antioxidante que controlan la oxidación. Considerando que estas especies son ricas en principios activos, ácidos fenólicos, flavonoides, aceite esencial, ácidos triterpénicos y alcoholes triterpénicos (González, 2013).

El método del blanqueamiento del β -caroteno es una buena alternativa para evaluar el poder antioxidante que poseen las sustancias de naturaleza lipofílica (Arcila et al., 2004). Asimismo, el uso de especies que tienen origen vegetal para determinar la capacidad antioxidante en carotenoides permite que se genere un valor agregado y se dé el aprovechamiento a nivel industrial. Además, contribuye a la disminución de importación de reactivos alimenticios, mediante la recuperación de los cultivos de estas especies que no son aprovechadas al máximo.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Evaluar la actividad antioxidante de especies vegetales *in vitro* mediante el blanqueamiento de carotenoides como sustituto libre de aditivos sintéticos en la industria alimentaria.

1.3.2 Objetivos Específicos

1. Comparar la capacidad antioxidante en aceites esenciales de las especies *Origanum vulgare* y *Thymus vulgaris* mediante el patrón butilhidroxitolueno (BHT).
2. Minimizar el uso de solventes y reactivos mediante la adaptación de microplacas, que garanticen la sustentabilidad del método.
3. Verificar la técnica de blanqueamiento de carotenoides mediante el procesamiento estadístico de los resultados experimentales y criterios de aceptación.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Aceites esenciales

Los aceites esenciales son sustancias fragantes y volátiles, producto del metabolismo secundario de las plantas (Flores, 2010). Son mezclas muy complejas que básicamente juegan un papel importante en la naturaleza como antioxidantes, antifúngicos, antivirales e insecticidas (Guerra, 2011).

Las plantas tienen la capacidad ilimitada para sintetizar estas sustancias aromáticas, siendo la mayoría fenoles o sus derivados oxígeno-sustituidos, terpenos o terpenoides y alcaloides (Borboa, 2009). En este contexto, los terpenos forman el grupo más grande de compuestos secundarios, ampliamente en el reino vegetal. El material vegetal contiene un buen porcentaje de humedad y para mantener todos sus componentes volátiles de interés, es recomendable emplear el secado natural (Gil, 2021).

El método de extracción depende del órgano vegetal objetivo, ya sean tallos, hojas o raíces. Además, para elegir el método de obtención es fundamental considerar donde está ubicada la sustancia aromática dentro de la estructura celular. Los principales métodos son: hidrodestilación asistida por microondas y destilación por arrastre de vapor (Naranjo & Chávez, 2015).

La destilación por arrastre de vapor es la forma más habitual de extraer los aceites esenciales. Durante este proceso, se inyecta vapor a una muestra vegetal para la evaporación de sus moléculas volátiles y después la condensación, generalmente a presiones y temperaturas ligeramente altas (Llorens Molina, 2009).

1.4.1.1 Orégano

El orégano es una planta aromática y medicinal, pertenece a la familia Lamiaceae y es originaria de la región mediterránea. Las especies más comunes con el nombre Orégano está el *Origanum vulgare* nativo de Europa y la *Lippia graveolens*, originaria de México. Los componentes principales de la especie *Origanum* están el alcanfor, el p-cimeno, el α -pineno, el limoneno, el linalol, el β -cariofileno, el carvacrol y el timol (Arcila et al., 2004).



Figura 1.1 *Origanum vulgare* (Plant, 2011)

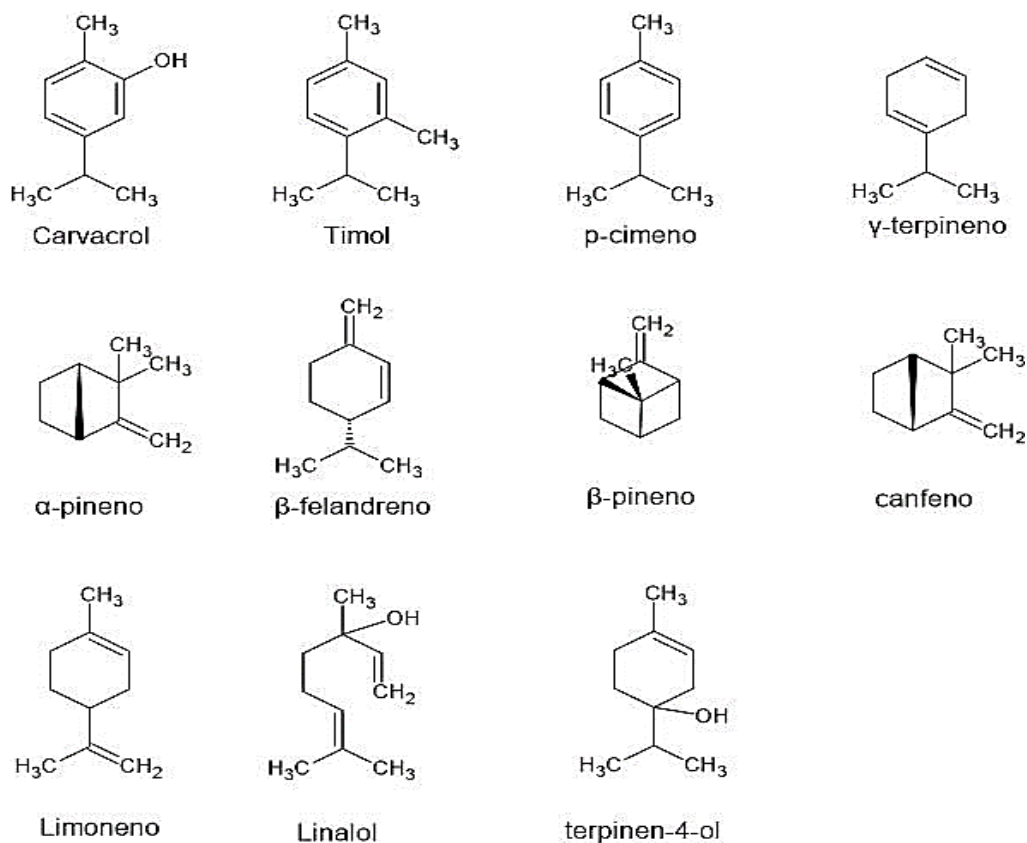


Figura 1.2 Estructura química de los principales componentes en orégano (Arcila et al., 2004)

1.4.1.2 Tomillo

El tomillo (*Thymus vulgaris*) es una planta aromática y medicinal perteneciente a la familia de las labiadas, originaria del Mediterráneo, el género *Thymus* tiene cerca de 400 especies de plantas herbáceas perennes aromáticas (Borugă et al., 2014). Los principales componentes son los fenoles monoterpénicos: timol en un 70% y carvacrol hasta en un 65%, junto con otros monoterpenos como canfeno, borneol, limoneno, p-cimeno, entre otros (Quiroz Velásquez et al., 2017).



Figura 1.3 Tomillo (*Thymus vulgaris*) (Unsimá, 2019)

El aceite esencial del tomillo está compuesto principalmente por monoterpenos oxigenados como el timol, carvacol y linalol, también monoterpenos hidrocarbonados como él y-terpineno, α -tujeno y α -pineno (Rota et al., 2008). Sin embargo, el carvacrol y timol están relacionados con las propiedades antibacterianas, antifúngicas, antitumorales y antioxidantes (Munóz, 1987).

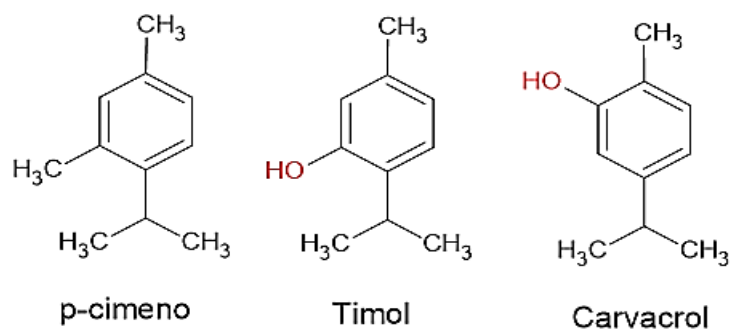


Figura 1.4 Estructura química de p-cimeno, timol y carvacrol (López et al., 2016)

1.4.2 Antioxidantes

Son sustancias químicas que pueden impedir la oxidación de un sin número de sustancias, como los ácidos grasos, cuyas reacciones se producen en los alimentos y el organismo. Se caracterizan por combatir los efectos provocados por el estrés oxidativo y la ausencia de oxígeno, mediante la estabilización de radicales libres (Zamora S., 2007).

1.4.2.1 Actividad antioxidante

Se puede determinar por los efectos que presenta el compuesto que posee estas propiedades antioxidantes dentro de un sistema de oxidación. Esta se puede medir a través de la formación de intermediarios de la reacción que se da entre el antioxidante y los radicales libres (Ndhlala et al., 2010).

Algunos ensayos realizados en el método *in vitro* se han destacado por medir la capacidad antioxidante en diferentes especies de origen vegetal. Estas, según su mecanismo de reacción, pueden ser clasificados por transferir átomos o electrones (Ndhlala et al., 2010).

1.4.3 Carotenoides

1.4.3.1 Generalidades

Los carotenoides son pigmentos extraídos de plantas, algas y bacterias que son solubles en grasas. Están localizados en células vegetales en la parte interna de los orgánulos: cromoplastos y cloroplastos. Por la insaturación muestran sensibilidad a parámetros como: moléculas de oxígeno, metales, el calor, los lípidos y los peróxidos. Debido a sus características fisicoquímicas, algunas especies vegetales y animales presentan una coloración amarillo, anaranjado o rojo (Quintana López et al., 2018).

Actualmente, existen alrededor de 700 carotenoides conocidos, de los cuales 200 son de origen marino. En la acuicultura, usan diferentes

carotenoides como aditivo para dar una coloración característica a diferentes organismos (Quintana López et al., 2018).

1.4.3.2 Distribución de los carotenoides

Los carotenoides poseen características que los hacen específicos por su sistema de dobles enlaces conjugados. Esta parte de la molécula es la responsable de que los carotenoides tengan la capacidad de absorber la luz en el espectro visible y, en consecuencia, de su capacidad de coloración (Carranco Jáuregui et al., 2011).

Para las verduras el contenido de carotenoides sigue la tendencia de los cloroplastos como la anteraxantina, violaxantina, neozantina, zeoxantina y β -caroteno; para los frutos, las xantofilas se encuentran como mayor abundancia en el licopeno. Se ha reportado científicamente que en ciertos frutos se encuentran presentes uno o dos carotenoides, como es el caso de los pimientos los cuales contienen capsorubina y capsantina (Carranco Jáuregui et al., 2011).

Tabla 1.1 Tipo de caroteno y presencia natural (Jessica., C. Fausto. Burgos, 2009)

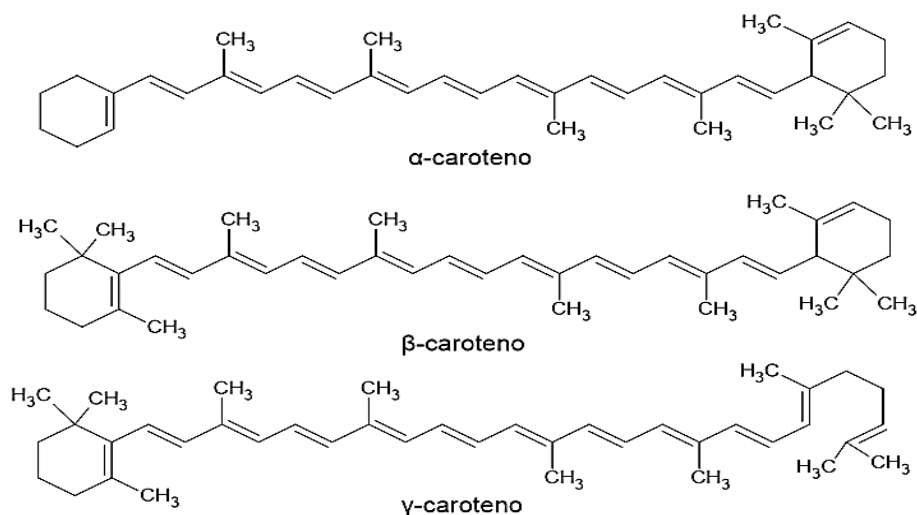
Tipo de Carotenoide	Presencia natural
Carotenos	
Licopeno, neurosporeno	Tomate y sandía
Especies de β -carotenos trans, lactucaxantina, transluteína	Lechuga
α - caroteno, β - caroteno, δ - caroteno, γ - caroteno, ϵ - caroteno, ζ - caroteno	Zanahoria, papa dulce y frutos secos.
Neoluteína, cis y trans luteína, 13-cis luteína, Trans β -caroteno.	Espinaca y brócoli
Fitoeno	Raíces de zanahorias, flores y frutas abundantes en carotenoides
Xantofilas	
Luteína, neoxantina, mutatoxantina y violaxantina	Flores y frutas verdes
Anteraxantina	Frutas, verduras y pétalos de flores amarillas

Luteína con zeaxantina	Brócoli, coles, maíz, lechuga y espinaca
Norbixina	Semillas de achiote
5,6-epóxido, capsantina	Pimiento Chile
β -criptoxantina, α -criptoxantina, criptoxantina 5,6-epóxido, Zeaxantina	Semillas de maíz, frutas como el maracuyá, el mango y la papaya.

1.4.3.3 Estructura de los carotenoides

La mayoría de los carotenoides son tetraterpenoides que son compuestos conformados por 40 átomos de carbono con ocho unidades isoprenoides, que se unen de forma secuencial para invertir la parte central de la molécula. Sin embargo, algunos poseen formas esqueléticas con menos de 40 átomos de carbono (Hassan et al., 2007).

Los carotenoides son carotenos que pueden ser ácidos o presentar un anillo hasta máximo 6 carbonos y las xantofilas son compuestos oxigenados que forman un grupo que contienen hidroxilos, epóxidos, aldehídos y cetonas (Hassan et al., 2007).



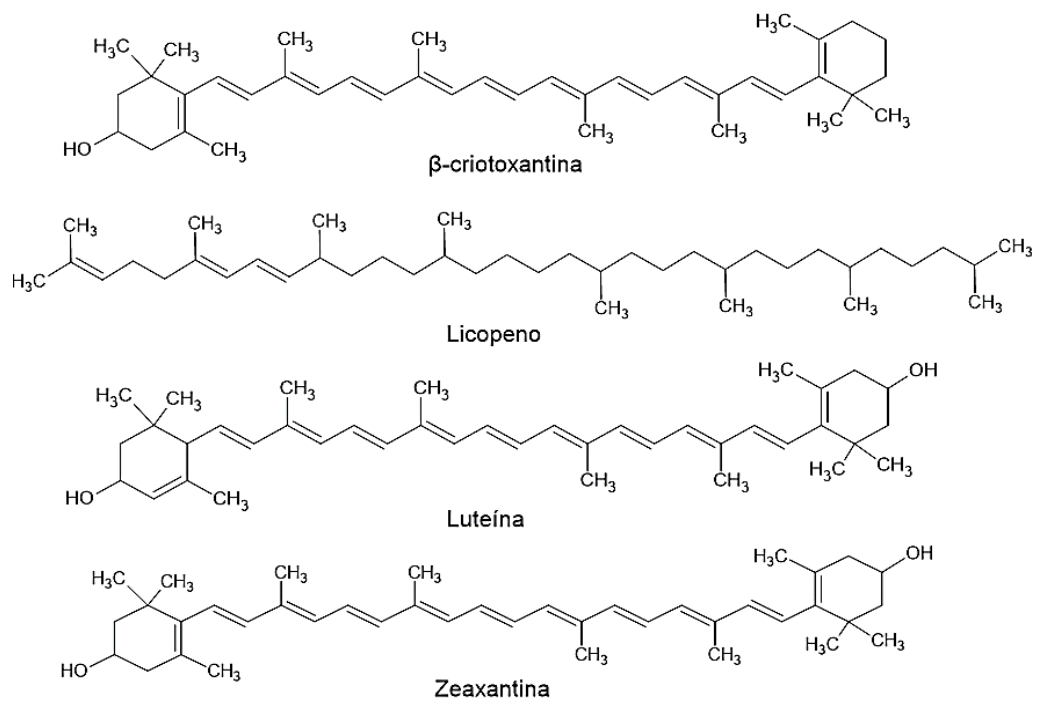


Figura 1.5 Principales estructuras de los carotenoides (Hassan et al., 2007)

1.4.3.4 Propiedades de los carotenoides

1.4.3.4.1 Propiedades fisicoquímicas

Los carotenoides son considerados como lípidos; sin embargo, son insolubles en agua y altamente solubles en disolventes como el cloroformo, el metanol, éter, hexano, y en ambientes lipofílicos, además con proteínas favorece a que mantengan posición correcta en comparación a otras moléculas (Meléndez et al., 2007).

Los carotenoides ácidos pueden formar sales solubles en agua, la coloración de estos complejos es estables a temperatura ambiente. La mayoría de los carotenoides al considerarse hidrofóbicos tienden a la agregación y cristalización en un medio acuoso (Meléndez et al., 2007).

Los enlaces dobles conjugados de los carotenoides se presentan en configuración cis y trans, por lo que sus reacciones por isomerización

implican tratamientos térmicos, exposición con solventes de carácter orgánicos, contacto con superficies activas, tratamientos con ácidos y la influencia de la iluminación en las disoluciones (Jessica., C. Fausto. Burgos, 2009).

1.4.3.4.2 Propiedades espectroscópicas

Los carotenoides presentan un sistema extenso de dobles enlaces las cuales se suelen representar como sustancias coloreadas. Un cromóforo que tiene siete o inclusive más dobles enlaces pueden absorber por radiación en la región visible, lo cual permite dar lugar a los colores característicos que tienen los pigmentos (Paredes Adamary, 2019).

El espectro visible de los carotenoides oscila desde los 400 nm a 500 nm, sin embargo, según reportes se observa una mayor cantidad cuando se encuentra alrededor de los 450 nm; por lo general, se observan dos picos máximos de absorción de cada lado cuando existen presencia de carotenoides (Paredes Adamary, 2019).

1.4.4 Blanqueamiento de B-caroteno

1.4.4.1 Fundamento

La reacción inicia con los radicales libres del ácido graso formándose por la protonación en uno de los grupos metilenos, los cuales atacaran al β -catoreno para que pierdan sus dobles enlaces. Además, el blanqueamiento de carotenoides por oxidación puede ser disminuida usando antioxidantes que donan un átomo de hidrógeno para neutralizar los radicales libres formados (Reyes Peter & León Claudia, 2017).

El método del blanqueamiento consiste en un sistema o emulsión, que junto a el ácido y el β -caroteno promueven la formación de radicales peroxilos, a

causa de la oxidación del ácido linoleico inducida por el calor provoca que el β -caroteno se blanquee en la emulsión.

Luego de preparar la emulsión, empleando un tensoactivo en la disolución con la finalidad de mejorar la estabilidad, se mezcla con agua previamente saturada de oxígeno, se adicionan los controles y la muestra (Lopez & García, 2008).

1.4.4.2 Uso de tensoactivos

Los tensoactivos o surfactantes son ésteres del polioxietilen sorbitano parcialmente esterificados con ácidos grasos superiores. Son moléculas anfifílicas, con una parte lipófila y otra hidrófila que los hace afines a las dos fases de la emulsión (Fernández et al., 2009).

El uso de tensoactivos en ensayos de blanqueamientos difiere en cuanto a autores, por ejemplo, Marcos (1968) realizó por primera vez la técnica, utilizó en sus ensayos Tween 20, Miller (1971), acopló la técnica Tween 40 y actualmente Tae-Hun (2003) utilizó Tween 80 (Reyes Peter & León Claudia, 2017). El nivel de estabilidad que proporciona un tensoactivo depende de su índice HLB, que da relación entre la porción lipófila e hidrófila del mismo (Sánchez, 1993).

Tabla 1.2 Principales tensoactivos con su respectivo índice HLB

Tensoactivo	HLB
Tween 80	15,0
Tween 40	15,6
Tween 20	16,7

Mientras mayor sean el índice HLB, mayor es su hidrofilia. Se recomienda utilizar el Tween 20 (Polioxietilen-20-sorbitan-monolaurato) para este tipo de ensayos, porque sus moléculas tienen grupos polioxietileno más hidrofílicos, por lo que los hace más estables en la fase acuosa de la emulsión (Reyes Peter & León Claudia, 2017).

El Tween 20 es un líquido aceitoso de coloración amarilla o ámbar y olor especial. El punto de ebullición es 100°C, índice de refracción 1.473 y densidad relativa 1.01. Se conoce por ser un agente emulgente no iónico con amplio poder suspensor, que originan emulsiones de fase externa acuosa O/W, estables, poco afectables por altas concentraciones de electrolitos o por cambios de pH (Clavijo & Comes, 2007).

1.4.4.3 Factores que afectan a la técnica

El blanqueamiento de β -caroteno, es un método que se usa para evaluar la actividad antioxidante en muestras lipofílicas. Los principales factores que interfieren en la técnica es la temperatura, el pH, los disolventes, el tiempo de incubación y concentración de los reactivos (Prieto et al., 2012).

El β -caroteno, uno de los constituyentes de la emulsión se caracteriza por ser fotosensible y termosensible; por lo que, al estar expuesta a la luz y temperatura ambiente induce a su decoloración y autooxidación prematura, provocando lecturas de absorbancia incorrectas (Reyes Peter & León Claudia, 2017).

1.4.5 Microplacas

Las microplacas son placas multipocillos utilizadas para ensayos, cultivo celular, almacenamiento, cuantificación y filtración de muestras. Fabricadas en diferentes materiales, el más común es el poliestireno, utilizado para la mayoría de las microplacas de detección óptica (Auld Dsph et al., 2020).



Figura 1.6 Microplaca de 96 pocillos (LabOlan, 2018)

Están disponibles en múltiples formatos, incluidos para placas de 24, 48, 96, 384, 864, 1536 pocillos y tiras de pocillos que encajan en los marcos de las placas. Cada pocillo de microplaca puede contener entre unas docenas de nanolitros y varios mililitros de líquido. Los pocillos pueden ser circulares o cuadrados (Auld Dsph et al., 2020).

1.4.6 Lector de microplacas

Es un dispositivo empleado para determinar reacciones biológicas, químicas e incluso físicas al medir la luz emitida u absorbida. Estos equipos realizan funciones básicas en comparación a un espectrofotómetro convencional, debido a que sus filtros de difracción limitan el rango de longitud de onda entre 400 a 750 nm. La luz que se emite por medio de este lector pasa por la muestra, y su sistema de detección amplifica la luz y establece su absorbancia(Fuller, 2010).

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

El principal objetivo del presente trabajo es evaluar la actividad antioxidante de especies vegetales *in vitro* mediante el blanqueamiento de carotenoides como sustituto libre de aditivos sintéticos en la industria alimentaria.

Mediante una revisión bibliográfica se procedió a seleccionar las especies vegetales que presentan un alto poder antioxidante, potencial reemplazo de sustancias sintéticas. Posteriormente, estas fueron recolectadas, secadas y clasificadas previo a experimentación. Esta fase se compone de tres partes: obtención de aceites esenciales, determinación de la capacidad antioxidante mediante el blanqueamiento de carotenoides y finalmente, la verificación de la técnica a partir de los resultados obtenidos.

2.1 Selección de especies

La selección de las especies se basó según su contenido de compuestos fenólicos como es el caso del carvacrol y timol, que poseen elevada actividad antioxidante.

Tabla 2.1 Selección de las especies

Nombre común	Nombre científico	Parte para destilar	Producto
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	Hojas y tallos	Hidrolato y aceite esencial
Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i>	Hojas y tallos	Hidrolato y aceite esencial

2.2 Recolección de especies

Las especies se recolectaron en el mercado mayorista de Ambato ubicada en la región sierra del Ecuador, registrando su ubicación con sus coordenadas y la fecha en la que se realizó la recolección. El orégano (*Origanum vulgare*) provienen de un cultivo ubicado en Patate y el Tomillo (*Thymus vulgaris*) proviene de Pasa. Además, esta investigación se realizó en el marco del contrato entre la ESPOL y el MAATE registrado con el código MAATE-DBI-CM-2022-0241.

La cantidad recolectada de orégano y tomillo fue de aproximadamente 5.5 kg de materia fresca y a continuación se detalla la información de la colecta de estas especies:

Tabla 2.2 Recolección de especies

Especie	Fecha	Región	Ubicación	Coordenadas
Orégano	30/05/2022	Sierra	Patate, Ecuador	-1.307191,-78.503035
Tomillo	30/05/2022	Sierra	Pasa, Ecuador	-1.265626,-78.741699

2.3 Secado de especies

Para esta sección, se emplea un secado natural bajo sombra a temperatura ambiente previo a que se realice la destilación.

2.3.1 Orégano

Dado a que las ramas y tallos de esta planta son de un tamaño considerable, se procedió a realizar atados para realizar el secado de estas. Esto se realizó con la finalidad de que puedan secarse bajo sombra sin que exista la interferencia de la luz solar directa y así evitar la pérdida de las propiedades de la especie. El secado duró aproximadamente 6 días.



Figura 2.1 Tendido de *O. vulgare*.

2.3.2 Tomillo

Esta especie tiene la particularidad de tener un tamaño pequeño y que sus hojas puedan desprenderse con facilidad, por lo que se recomienda que el material

vegetal sea colocado sobre algún material. En este caso, reposaron sobre hojas de papel para evitar que se pierda la materia prima y que el aire pueda circular, permitiendo que el secado ocurra con uniformidad, en comparación con el orégano, esta especie se secó en 4 días.



Figura 2.2 Secado de *T. vulgaris*

2.4 Obtención de aceites esenciales

2.4.1 Método de extracción

Para la obtención de aceites esenciales se empleó la técnica de destilación por arrastre de vapor utilizando un sistema a escala piloto, este consiste en un hervidor de acero inoxidable de 55 litros, un condensador en la parte superior con adaptación de una trampa de clewenger o embudo de decantación con la finalidad de separar el hidrolato y aceite esencial.

La cantidad de materia prima que se utiliza para cada uno de los ciclos varía dependiendo de la especie, y esto se debe a sus características como el tamaño y grosos de hojas y tallos, dado a que con cantidades excesivas de materia se puede dificultar el paso de vapor, influyendo en el rendimiento final.

Es importante destacar que un ciclo involucra el sistema encendido, el tiempo que tarda en caer la primera gota de aceite y el tiempo hasta que el sistema se encuentre apagado. Además, primero se debe realizar una limpieza previa en el

sistema cada vez que se vaya a utilizar con el objetivo de eliminar las impurezas que pueda tener este. Para la extracción de ambos aceites se trabajó con una relación 1:10 (p/v), y la cantidad de agua necesaria para cada extracción dependerá de la cantidad de materia prima que se emplee en el sistema.

2.4.2 Aceite esencial de Orégano

El proceso de extracción se realizó en 6 ciclos, usando 1759,79 g de materia seca, y la cantidad de agua depende de la materia prima que se suministra para realizar el proceso de destilación. Al sistema se le añadió un embudo de decantación de 250 mL con el propósito de separar el aceite esencial del hidrolato. La destilación tuvo una duración de 6 horas y 18 min. La cantidad que se emplea, la cantidad de ciclos y tiempo se detalla en la siguiente tabla:

Tabla 2.3 Cantidad de orégano empleado por ciclo

Ciclo	Cantidad de materia seca(g)	Tiempo(min)
1	149.48	60
2	150.53	45
3	260.11	42
4	249.56	68
5	249.65	55
6	291.51	48
Total	1350.84	

2.4.3 Aceite esencial de Tomillo

Para obtener el aceite se emplearon 2850.26 g de hojas y tallos de tomillo, previamente secas. Al igual que la destilación del orégano, esta se le adapta una trampa de clavenger con el fin de separar el aceite luego de finalizar el proceso. Esta especie pese a que es liviana posee un gran volumen, por lo tanto, se realizaron 6 ciclos cada uno con su respectivo tiempo de obtención y cantidad de agua empleada. El tiempo que duró la obtención de este aceite fue de 8 horas y 45 minutos, a continuación, se detalla los ciclos empleados en esta extracción:

Tabla 2.4 Cantidad de tomillo empleado por ciclo

Ciclo	Cantidad de materia seca(g)	Tiempo(min)
1	257.34	80
2	256.64	82
3	256.99	36
4	257.31	40
5	153.40	45
6	248.47	60
Total	1430.15	

2.4.4 Purificación de muestras de aceite

Se utilizó sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) para eliminar el agua residual en las muestras de aceite de orégano y tomillo.

2.5 Estandarización previa al método para la determinación de Actividad Antioxidante

Se realizó una estandarización previa con parámetros como tiempo de reacción, longitud de onda y sustancia de referencia para la curva de calibración. Todos los análisis se realizaron en un lector de microplacas. Primero se preparó la emulsión de la reacción utilizando β -caroteno, ácido linoleico, Tween 20 y agua saturada con oxígeno, además de preparar el blanco que es la mezcla de ácido linoleico, Tween 20 y agua oxigenada.

En la microplaca para el estándar se agrega 150 μL de emulsión y 50 μL de BHT, y para el control negativo 150 μL de emulsión con 50 μL de metanol. Además, se realiza el mismo procedimiento con los aceites esenciales con el fin de establecer la longitud de onda óptima para realizar las lecturas en el espectrofotómetro. Consecuentemente, al haber seleccionado una longitud de onda se realizan lecturas para estudiar la cinética de la reacción y estudiar el tiempo necesario de incubación de la muestra para que se logre la longitud de onda, esto se estudiará en 0 y 60 min. Cabe destacar que estos análisis se realizaron por triplicado para verificar la precisión de los datos y detectar algún valor aberrante que influya en la

estandarización de la técnica. Finalmente, se evalúan parámetros como la concentración, preparación de reactivos y cantidad de agua empleada con el fin de obtener resultados efectivos en la técnica.

2.5.1 Determinación de la Actividad Antioxidante

2.5.1.1 Preparación de la Emulsión de B- caroteno

Se preparó una solución de 2.5 mg β -caroteno en 5 mL de cloroformo en un matraz aforado de 5 mL, luego se agregó 500 μ l de la solución de β -caroteno más 25 μ l de ácido linoleico dentro de un balón de 100 mL de capacidad, además se añadió 200 μ l Tween 20 para estabilizar la emulsión (Loucif et al., 2020).

Posteriormente, se evaporó el cloroformo que se utiliza en la solución de β -caroteno por medio de un Heidolph Rotary Evaporator, Laborota 4001 a una temperatura de 35°C y durante aproximadamente 6 min, ya que la presencia de cloroformo en la emulsión puede causar turbidez, desgastar el material de la microplaca y alterar las lecturas de absorbancias. Luego, se agregó 5 alícuotas de 10 mL de agua oxigenada al 20% y se llevó a un baño de ultrasonido durante aproximadamente 2 minutos hasta la formación de una emulsión de coloración traslúcida amarilla (Dawidowicz & Olszowy, 2010), como se observa en la figura 2.3.



Figura 2.3 Emulsión de coloración traslúcida amarilla

2.5.1.2 Preparación del Blanco de Reactivo

Al mismo tiempo de la preparación de la emulsión, se agrega los mismos compuestos y cantidades que conforman la emulsión sin la solución de β -caroteno en cloroformo. Una vez que se realiza la preparación, se le agrega agua oxigenada, se agita vigorosamente y se lleva a un baño con ultrasonido por 3 o 4 minutos hasta formar una emulsión transparente.

2.5.1.3 Preparación de disolución y control positivo

Se preparará 8 disoluciones con concentraciones diferentes de los aceites esenciales de cada especie. Además, se debe preparar la misma cantidad de concentraciones con el control positivo BHT por ensayo de cada especie en una mezcla de solventes: Metanol 95 % - DCM 5 %.

Tabla 2.5 Concentración de las disoluciones de los aceites y BHT

Aceites esenciales	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
Tomillo	500	250	125	62.5	3.25	15.62	7.81	3.90
Orégano	500	250	125	62.5	31.25			
Control positivo	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7	CP8
BHT	500	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90

Sn: Diluciones a diferente concentración de cada aceite esencial.

CPn: Diluciones a diferente concentración del control positivo.

2.5.1.4 Ensayo de Actividad Antioxidante

En una microplaca con múltiples pocillos que simulan pequeños tubos de ensayo, se debe colocó las diferentes concentraciones de los aceites esenciales, patrón BHT y controles realizados, correctamente identificados. Se utilizó un Cytation™5, BioTek para la lectura de la microplaca, en el cual se programó la longitud de onda a 450 nm y se enceró con el blanco previamente preparado, el mismo que debe indicar

una absorbancia de 0.120 – 0.130 según la literatura, antes de encender el quipo.

Luego, se distribuyó de forma uniforme la emulsión de β -caroteno en los pocillos de la microplaca, controlando que su absorbancia no se encuentre entre 0.200 a 0.210. Luego, se añadieron los aceites esenciales y controles como se observa en la tabla 2.6

Tabla 2.6 Distribución de disoluciones en μ l de blanco, control negativo, control positivo y aceites esenciales en la microplaca

						AE TOMILLO H-T 1000 PPM				CONTROL + (BHT)			
A	BLANCO	200	200	200	200	500	500	500	500	500	500	500	500
B	CONTROL -	200	200	200	200	250	250	250	250	250	250	250	250
C		200	200	200	200	125	125	125	125	125	125	125	125
D	AE OREGANO 1000 PPM	500	500	500	500	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5
E		250	250	250	250	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25
F		125	125	125	125	15.62	15.62	15.62	15.62	15.62	15.62	15.62	15.62
G		62.5	62.5	62.5	62.5	7.81	7.81	7.81	7.81	7.81	7.81	7.81	7.81
H		31.25	31.25	31.25	31.25	3.90	3.90	3.90	3.90	3.90	3.90	3.90	3.90

Inicialmente, se leyó la absorbancia a tiempo cero de cada muestra y controles dispuestos. Posterior a eso, se incubaron las muestras en un Incubador (IN30, memmert) 50°C durante 1 hora y se tomó lectura de la absorbancia final. (Prieto et al., 2012)

2.6 Representación de resultados

2.6.1 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante se calculó en términos de porcentaje de inhibición con respecto al control negativo.

$$AA(\%) = \left(\frac{R_{control} - R_{muestra}}{R_{control}} \right) * 100 \quad (\text{Ec.1})$$

La tasa de blanqueamiento del control ($R_{control}$):

$$R_{control} = \frac{\ln \left(\frac{A_{ec}}{A_{ct}} \right)}{t} \quad (\text{Ec.2})$$

Donde:

A_{ec} : absorbancia de la emulsión con el control a t=0 min

A_{ct} : absorbancia del control en el instante t=60 min

t: tiempo de incubación

La tasa de blanqueamiento de la muestra ($R_{muestra}$):

$$R_{muestra} = \frac{\ln \left(\frac{A_{em}}{A_{mt}} \right)}{t} \quad (\text{Ec.3})$$

Donde:

A_{em} : absorbancia de la emulsión con la muestra a t=0 min

A_{mt} : absorbancia de la muestra en el instante t=60 min

t: tiempo de incubación

2.6.2 IC₅₀

La concentración inhibitoria máxima es una media cuantitativa que indica la cantidad de una sustancia inhibidora particular que se necesita inhibir in vitro, en un proceso determinado en un 50%. Para el método en específico, representa la concentración de la muestra o el estándar a la cual se obtiene un 50% de inhibición del blanqueo de β -caroteno.

Inicialmente se grafica las AA% para cada muestra vs ln de la concentración evaluada, y a partir de las ecuaciones obtenidas de la curva se determina la IC₅₀ de cada muestra (Lina et al., 2013).

2.7 Análisis Estadístico

Se realiza un análisis empleando la técnica de ANOVA con la finalidad de comprobar si existen diferencias significativas entre las variables que involucran este estudio. Las 3 variables involucradas que se requieren comparan son las actividades antioxidantes para el estándar y los aceites esenciales obtenidos. Para eso se establece la estructura de la tabla que se reportará para encontrar el estadístico F (tabla 2.7), que es un valor calculado a partir de los datos de actividades antioxidantes, para así compararlos con un valor crítico que se obtienen mediante la distribución F con cola a la derecha (Dagnino, 2014).

Tabla 2.7 Estructura de ANOVA (Dagnino, 2014)

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F
Entre las muestras	$SC_{Trat} = \sum_{i=1}^k n_i (\bar{x}_i - \bar{x}_{..})^2$	$k - 1$	$CM_{Trat} = \frac{SC_{Trat}}{k - 1}$	$F = \frac{CM_{Trat}}{CM_{Error}}$
Dentro de las muestras	$SC_{Error} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_j} (\bar{x}_{ij} - \bar{x}_{.i})^2$	$N - k$	$CM_{Error} = \frac{SC_{Error}}{N - k}$	
Total	$SC_{Total} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_j} (\bar{x}_{ij} - \bar{x}_{..})^2$	$N - 1$		

Las hipótesis que se establecen para realizar el análisis de varianzas de un factor vienen relacionadas a las medias o desviaciones estándar de los diferentes grupos o muestras involucradas en el estudio, para esto se establecen las hipótesis a continuación:

H₀: No hay diferencias entre las medias de las actividades antioxidantes de las muestras ($\mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k = \mu$)

H₁: las medias de las actividades antioxidantes de las muestras son distintas.

Por otra parte, se realizó un análisis mediante el método de Tukey, que está estrechamente relacionado con ANOVA, con el propósito de conocer si existen diferencias significativas en un par de variables luego de haberse rechazado la hipótesis

nula. En este se calcula el estadístico T_α para luego comparar con las diferencias muestrales y tomar la decisión si existe o no diferencias significativas entre dos variables, tal como lo muestra la tabla 2.8(Vargas C & Vargas C, 2013).

Tabla 2.8 Análisis método de Tukey

Diferencia poblacional	Diferencial muestral
$u_{orégano} - u_{tomillo}$	$x_{orégano} - x_{tomillo}$
$u_{orégano} - u_{BHT}$	$x_{orégano} - x_{tomillo}$
$u_{tomillo} - u_{BHT}$	$x_{orégano} - x_{tomillo}$

El estadístico de Tukey se puede calcular a partir de la siguiente ecuación:

$$T_\alpha = q_\alpha(k, N - k) \sqrt{\frac{CM_{Error}}{n_i}} \quad (\text{Ec.4})$$

Donde:

q_α : Cuantil de la distribución de Tukey

k: número de muestras

N: número total de datos

CM_{Error} : cuadrado medio del error

n_i : número de grupos/variables

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Obtención de aceites esenciales

Se realizó la extracción de los aceites esenciales de 2 especies, empleando la técnica de arrastre de vapor a escala piloto. Los rendimientos y tiempos aproximados de extracción se encuentran registrados en la tabla 3.1, en donde se aprecian valores de acuerdo con la especie, parte de la planta utilizada y la zona geográfica del lugar de cultivo.

Tabla 3.1 Resultados de destilación de aceites esenciales

Especie	Cantidad de materia vegetal (g)	Cantidad de aceite esencial extraído (mL)	Cantidad de hidrolato obtenido(mL)	Tiempo de extracción
Orégano	1511.19	1.7	6615	6h18
Tomillo	2850.26	4.7	5100	8h45

Se puede destacar que el aceite de ambas especies, a pesar de ser extraídos bajo la misma metodología, presentan diferencias significativas respecto a la cantidad de producto en mL y tiempo de extracción. En primera instancia, para el orégano se obtuvo 1.7 mL y aproximadamente de 6 horas de extracción. En cambio, en el tomillo se obtuvo 4.7 mL y un tiempo de extracción de 8 horas.

La variedad de las plantas, su manejo e incluso su densidad son las principales causas por las que varía la cantidad de aceite extraído. El tomillo a pesar de ser una planta liviana, ocupa gran volumen y esto permite que exista mayor contacto del vapor con sus hojas y, por tanto, la mayor parte del vapor suministrado es aprovechado para lograr el rompimiento de las células que contienen el aceite esencial. Al contrario, ocurre con el orégano, que, al ser una planta con menos volumen, no se logra aprovechar el vapor, ya que este tiende a tomar canales preferenciales por donde encuentra menos resistencia a su paso, disminuyendo la extracción del aceite (Arango et al., 2012).

3.2 Rendimiento de la extracción de aceites esenciales

Para obtener el rendimiento de la destilación se consideró la cantidad de materia prima suministrada en el proceso y el peso del aceite esencial (Arriola & Monjaras, 2003). Inicialmente, se determinó la densidad experimentalmente para así mediante el volumen de aceite reportado en la tabla 3.1 obtener la cantidad en peso para cada aceite. Los valores reportados para la densidad y el índice de refracción se muestran en la tabla 3.2 a continuación:

Tabla 3.2 Densidad e índice de refracción de cada especie (Cáceres et al., 2021)

Especie	Densidad(g/mL)		Índice de refracción (nD)	
	Experimental	Teórica	Experimental	Teórica
Orégano	0.869	0.923	1.50277	1.4615
Tomillo	0.907	0.939	1.49656	1.504

La densidad e índice de refracción son factores útiles que establecen el grado de pureza y control de calidad básico de los aceites extraídos. En relación con estos resultados, como se puede observar en la Tabla 3.2, el tomillo presenta valores muy similares a los reportados teóricamente, con un margen de error del 3.40% para la densidad y para el índice de refracción. Por otra parte, el orégano reporta un valor no tan cercano con un porcentaje de error del 5.85% para la densidad y 2.77% para el índice de refracción.

La calidad de los aceites es aceptable, puesto a que los resultados de las densidades y los índices de refracción para ambas especies se encuentran dentro de un rango permisible que destaca la pureza de estos. Además, no se presentan márgenes de error elevados con respecto a los datos reportados en los estudios de referencia. Los factores que pudieron influir en las diferencias de los valores teóricos y experimentales vienen estrechamente relacionados con la eficiencia que tiene el sistema de destilación, la calidad y las condiciones a las que se realizó el tratamiento previo de la materia prima.

En la tabla 3.3 se muestran los valores calculados del rendimiento para ambas especies vegetales empleadas, además se incluye el valor del rendimiento bibliográfico de los aceites esenciales obtenidos.

Tabla 3.3 Rendimientos del proyecto vs Rendimientos bibliográficos (Arango et al., 2012; Cano et al., 2001)

Especie	Rendimiento proyecto (%p/p)	Rendimiento bibliográfico (%p/p)
Orégano	0.12	2.76
Tomillo	0.30	0.405


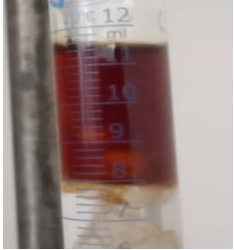
Ambos aceites fueron obtenidos con los mismos métodos y similares condiciones de extracción; sin embargo, la altitud, las condiciones agronómicas (pH, nivel de fertilizante, tipo de suelo) y el tiempo de cosecha influyen en la composición química, la actividad biológica y en el rendimiento de los aceites, debido al tipo y cantidad de nutrientes absorbidos (Cano et al., 2001).

El orégano fue cosechado en el mes de mayo en condiciones agroclimáticas de sierra; sin embargo, (Corella & Ortega, 2013), sugieren que el corte de la planta debe realizarse entre los meses de septiembre a diciembre, épocas que presentan temperaturas favorables. Esta limitante pudo ser una posible causa para que el rendimiento real con el teórico presente poca similitud.

En cuanto al tomillo, este fue recolectado al mismo tiempo y condiciones que el orégano, lo cual resultó conveniente para maximizar el rendimiento del aceite, dado que la mejor época para la cosecha de esta planta es a finales de primavera, cuando el 50% de las flores han florecido (Farmer, 2017). Esto se puede corroborar, ya que, el resultado experimental es muy cercano al dato teórico.

A continuación, en la tabla 3.4 se especifican las características organolépticas de los aceites esenciales de cada especie.

Tabla 3.4 Características organolépticas de los aceites esenciales de cada especie

Especies	Características organolépticas	
Orégano	Consistencia ligeramente viscosa, color amarillo pardo, olor característico, aromático y picante.	
Tomillo	Consistencia viscosa, de coloración naranja, olor característico herbáceo y ligeramente picante.	

En casa ciclo de extracción se obtuvo aproximadamente 1.5 litros de destilado herbal, que, a pesar de ser especies diferentes, tenían características similares: suspensión coloidal de aceites esenciales y componentes hidrosolubles, con tonalidad blanquecina y olor característico herbáceo.

3.3 Estandarización previa a la determinación de actividad antioxidante

Previo a realizar la evaluación de la actividad antioxidante empleando el método del blanqueamiento de carotenoides, es indispensable establecer las condiciones óptimas para las cuales se leerá la longitud de onda dentro del espectrofotómetro, además de analizar el tiempo óptimo para el cual se debe realizar la incubación en la microplaca. Por tal motivo, se realizó un barrido espectral con las diferentes muestras y controles, además evaluar la cinética de la reacción para lograr obtener el tiempo donde el control negativo haya logrado su máxima degradación.

3.3.1 Barrido espectral

El barrido espectral se realizó entre 300 y los 800 nm, debido a que, en ese rango de longitud de onda, la luz es visible. Se utilizó los aceites extraídos de las especies analizadas, un control negativo (metanol), el blanco y el antioxidante sintético BHT, con la finalidad de encontrar el λ más adecuado para obtener un margen de error mínimo (Eunice et al., 2016).

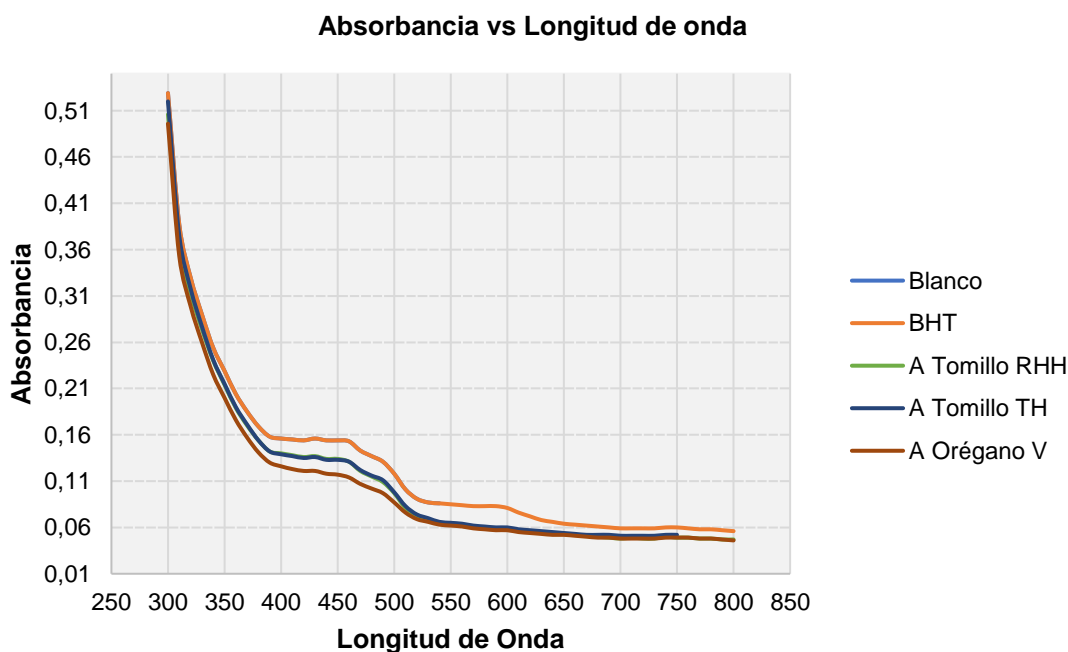


Figura 3.1 Barrido espectral de aceites de las especies, blanco y control positivo.

Según la figura 3.1, los picos de las muestras coinciden en una longitud de onda aproximadamente de 450 nm. (Hurst, 2002) en su investigación menciona, que el espectro de luz visible característico de los pigmentos carotenoides está en un rango de 400 nm a 500 nm y se observa un máximo alrededor de 450 nm. La posición de máxima absorción puede variar dependiendo de la interacción de las moléculas con el solvente en el cual se ha sido disuelto.

Las muestras se disolvieron en metanol, que, al ser de baja polaridad posee poco efecto sobre la posición máxima de absorción, de hecho, para un determinado carotenoide, las longitudes de onda son muy similares en metanol, etanol y hexano (J. Burgos & Calderon, 2009).

3.3.2 Cinética de la reacción

Se realizó la cinética de la reacción con el estándar y el control negativo (metanol), con la finalidad de analizar el comportamiento que presentan los mismos y predecir el tiempo óptimo de incubación en las condiciones determinadas de

temperatura, presión y concentración de las muestras. Es importante aclarar que este estudio se realizó para diferentes días, puesto que se realizaron modificaciones para los datos experimentales de cada uno de los reactivos y solventes empleados en la práctica. En la figura 3.2 se puede observar una gráfica de absorbancia vs tiempo, donde se trabajó durante un tiempo de incubación de 210 min, realizando lectura de absorbancias cada 30 minutos para observar el cambio aparente en cada intervalo de tiempo.

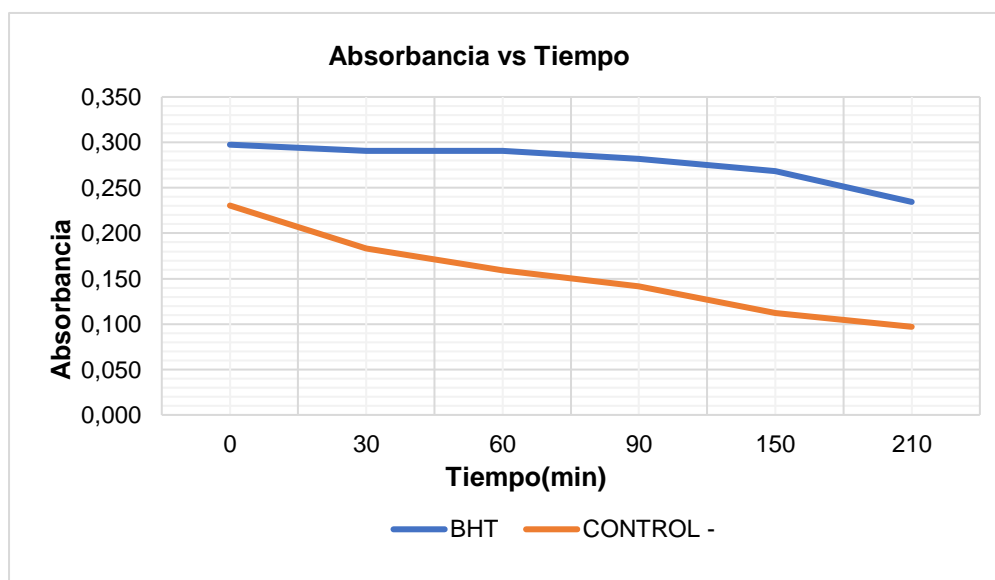


Figura 3.2 Cinética de la reacción (BHT y Control)

Al analizar la tendencia de estas curvas se puede especificar que a medida que transcurre el tiempo de incubación para la microplaca que contiene el estándar y control negativo, presentan disminución en sus valores de absorbancia. En referencia a esto, se observa que a un tiempo de 60 min el BHT logra tener cambios insignificantes en sus absorbancias por lo que se podría establecer que este es el tiempo óptimo para realizar la lectura de las muestras de aceites esenciales; además, se puede observar que el control negativo desde su segunda lectura de tiempo presenta una degradación significativa por lo que se puede comparar que en función al BHT, este si presenta un buen poder antioxidante dado a que evita la degradación de la muestra en un tiempo determinado.

Una vez que el BHT experimenta un tiempo de incubación por encima de los 60 min, la absorbancia disminuye constantemente, evidenciando una degradación de

la muestra a pesar de ser un antioxidante sintético; sin embargo, las lecturas se realizaron hasta los 210 min, tiempo en el que el control negativo se degrada por completo.

3.4 Actividad antioxidante

Se procedió a obtener la actividad antioxidante por triplicado siguiendo la metodología propuesta, tanto de los antioxidantes naturales (aceite de orégano y tomillo) como del sintético BHT. En el método de blanqueamiento de β -caroteno, la medida de actividad antioxidante se basa en la cinética de descomposición del compuesto cromóforo.

Una vez obtenidas las medidas espectrofotométricas de cada réplica, se procedió a calcular la actividad antioxidante de los aceites a diferentes concentraciones. Los resultados obtenidos a 0 y 60 minutos de incubación se expresan en el Apéndice B. A continuación, en la tabla 3.5 se detallan las absorbancias y la actividad antioxidante tanto del BHT y cada una de las disoluciones preparadas, al cabo de 1 hora de incubación.

Tabla 3.5 Actividad antioxidante de aceites esenciales y BHT

Código	Concentración (ppm)	Promedio absorbancia t=0 min	Promedio absorbancia t=60 min	%AA
BHT	500	0.223	0.2063	86.43
	250	0.225	0.1937	72.19
	125	0.219	0.1810	62.89
	62.5	0.217	0.1630	42.49
	31.25	0.220	0.1603	36.06
	15.625	0.220	0.1583	33.28
	7.8125	0.214	0.1515	29.06
	3.90625	0.213	0.1460	21.28
<i>O. vulgaris</i>	500	0.2117	0.1547	35.96
	250	0.2167	0.1490	22.75
	125	0.2133	0.1503	27.95
	62.5	0.2075	0.1463	27.52
	31.25	0.2220	0.1490	17.79
<i>T. vulgaris</i>	500	0.2173	0.2127	98.11
	250	0.2207	0.2167	98.77

	125	0.2173	0.1983	83.86
	62.5	0.2123	0.1717	58.22
	31.25	0.2137	0.1627	45.21
	15.625	0.2153	0.1633	44.52
	7.8125	0.2133	0.1537	32.89
	3.90625	0.2143	0.1540	32.42

En base a estos resultados se puede observar que para el caso del BHT, sus valores de absorbancia entre 0 y 60 minutos no disminuyeron significativamente, por lo que se puede asegurar una degradación insignificante en este intervalo. De la misma forma, para el tomillo se denotan cambios insignificantes en las absorbancias registradas asegurando poca degradación de la muestra. En cambio, en el orégano se observa, según sus valores registrados de absorbancia un cambio notorio en estos, por lo que se puede explicar que hay una degradación dentro de la reacción.

Por otra parte, se obtuvieron los porcentajes de actividad antioxidante para cada una de las concentraciones y especies. Para las tres muestras su máximo valor de actividad antioxidante se logró a la mayor concentración propuesta. (Vásquez, 2012) en su estudio “El orégano de monte (*Lippia origanoides*) del Alto Patía: Efecto del método de obtención de sus extractos sobre la composición y la actividad antioxidante de los mismos” indica que el BET está basado principalmente en la pérdida de color amarillo del β -caroteno debido a su reacción con radicales libres resultantes de la oxidación del ácido linoleico. La proporción del blanqueamiento puede bajar lentamente con la adicción de los aceites que contienen antioxidantes, por lo que se podría confirmar que, a concentraciones altas de aceites, indican menos degradación y, por ende, una actividad antioxidante más alta.

La actividad antioxidante para el control positivo (BHT) a una concentración de 500 ppm es del 86.43%, para el orégano 35.96% y tomillo 98.11%, estimando que el tomillo es un buen antioxidante y esto se debe a que presenta porcentajes altos de timol. En la tabla 3.6 se muestra el máximo valor de actividad antioxidante en las especies vegetales extraídas y los valores referenciales de las actividades antioxidantes de las mismas.

**Tabla 3.6 Actividad antioxidante del proyecto vs Actividad antioxidante bibliográfica
(Arango et al., 2012; Cano et al., 2001)**

Código	%AA (Proyecto)	% AA (Bibliografía)	Relación existente
Orégano	35.96	31.53	0.877
Tomillo	98.77	90.9	0.920

Para realizar la comparación de los valores obtenidos en el presente ensayo con las referencias, se determinó la relación existente entre los %AA. La actividad antioxidante del orégano es de 35.96%, equivalente a un 87.7% de la referencia. Asimismo, para el tomillo se obtuvo experimentalmente una actividad antioxidante de 98.77% el cual representa una diferencia evidente y por encima del valor teórico. Pese a que para ambas especies se haya obtenido porcentajes de inhibición por encima de los datos reportados bibliográficamente, no necesariamente son sinónimos de buenos antioxidantes en carotenoides, puesto a que el orégano presenta una actividad antioxidante muy baja en comparación al tomillo, haciendo que este último sea más eficiente para evitar o disminuir la degradación dentro de la emulsión durante 1 hora de incubación.

3.4.1 IC₅₀

Esta medida se refiere a la concentración que tiene el aceite esencial de tomillo y el BHT para inhibir el blanqueamiento del β -caroteno, este se obtuvo mediante las actividades antioxidantes calculadas en función a la tasa de degradación, el tiempo de incubación, y las concentraciones respectivas.

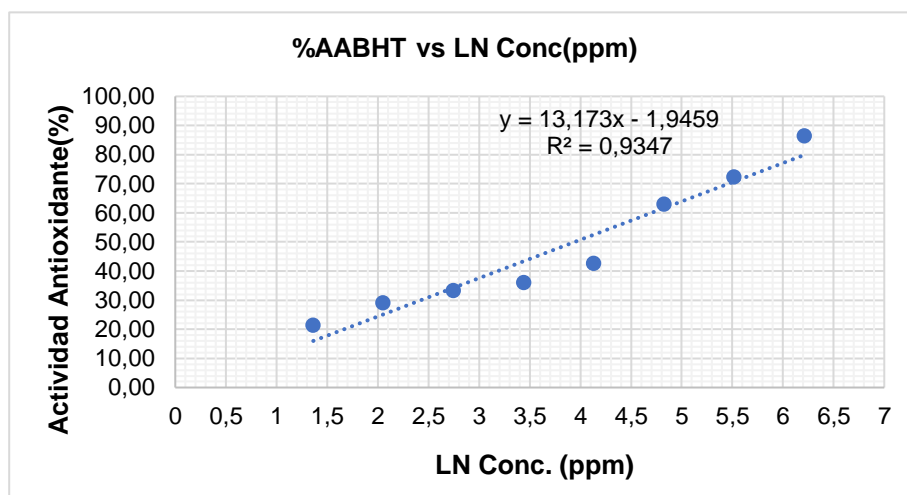


Figura 3.3 %AA BHT vs LN conc (ppm)

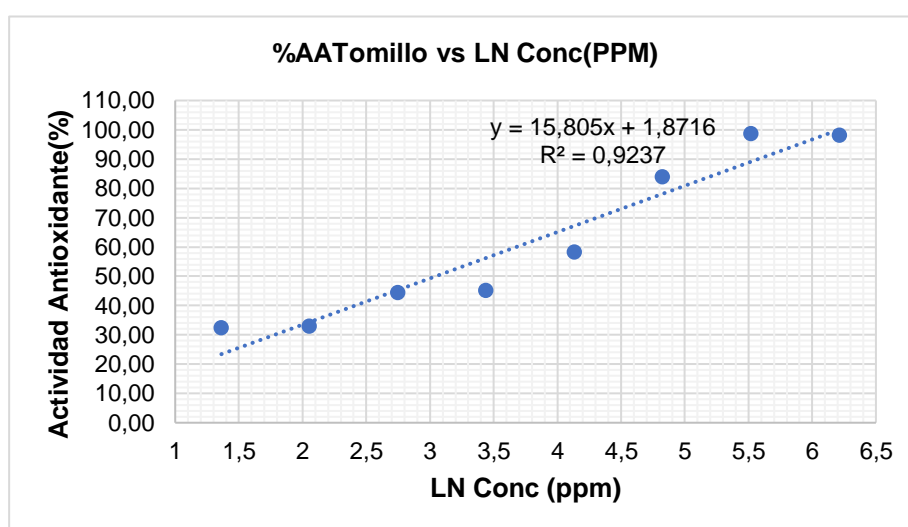


Figura 3.4 %AA Tomillo vs LN conc (ppm)

Tabla 3.7 IC₅₀ de BHT y *T. vulgaris*

Código	IC ₅₀ (ug / mL)
BHT	51.59
<i>T. vulgaris</i>	21.01

Para el orégano se realizaron diluciones hasta 31.25 ppm por lo que no logra obtener la tendencia por completo y analizar el IC₅₀, sin embargo, para el tomillo y BHT se establecieron las respectivas tendencias como se pueden observar en las figuras 3.3 y 3.4. En la tendencia del tomillo en función al logaritmo de la concentración se puede destacar el comportamiento lineal por lo que la concentración para que se inhiba blanqueamiento del b-caroteno en un 50% es 21.01 ppm con actividad antioxidante del 98.77%, que comparado con el del BHT que posee un IC₅₀ de 51.59 pm y actividad antioxidante 86.43%, presenta una actividad antioxidante aceptable por encima del estándar.

3.5 Análisis ANOVA

La técnica estadística que se emplea en el proyecto serán el análisis de varianza con un nivel de significancia de 0.05 y método de Tukey. ANOVA (Analysis of variance), también conocida como análisis factorial es una herramienta fundamental para estudiar el efecto que tienen los diferentes factores sobre la media de las variables estudiadas, es decir, se logra comparar medias de dos o más grupos (Rodrigo, 2016). Por otra parte, el método de Tukey viene relacionada con ANOVA puesto a que se usa para comparar un número determinado de comparaciones en pares, por lo que se puede tomar la decisión mediante este estadístico si existen diferencias significativas entre ellas (García et al., 2001).

Para iniciar con el análisis de varianza fue necesario establecer los supuestos para comprobar mediante el estadístico F si se rechaza o no la hipótesis nula. Los datos que se trabajarán son las actividades antioxidantes para el estándar y los aceites esenciales (orégano y tomillo) con la finalidad de conocer si existen diferencias significativas en las medias de estos valores. Sin embargo, ANOVA únicamente verifica si hay diferencias entre estas tres variables, por lo tanto, se realizó el análisis de Tukey como apoyo, para conocer si hay diferencia entre las actividades antioxidantes del orégano y del tomillo con comparado con el BHT para determinar si estos aceites esenciales naturales sirven como sustituto libre de antioxidantes sintéticos.

Tabla 3.8 Actividades antioxidantes de las especies analizadas

No	Orégano	Tomillo	BHT
1	35.96%	98.11%	86.43%
2	22.75%	98.77%	72.19%
3	27.95%	83.86%	62.89%
4	27.52%	58.22%	42.49%
5	17.79%	45.21%	36.06%

Como se puede observar en la tabla 3.8. representan las actividades antioxidantes con las que se va a realizar el análisis de varianza. Luego de calcular la media e identificar todas las variables necesarias para completar la tabla ANOVA: suma de cuadrados entre las muestras y dentro de las muestras, cuadrado medio e identificar los grados de

libertad, se obtuvo que el valor F es de 9.32. Este último, comparándolo con el valor crítico que se obtiene mediante la distribución F con cola a la derecha que es 3.89, se rechaza la hipótesis nula y se establece que hay diferencias significativas entre las medias de las actividades antioxidantes para los tres grupos. Además, se rechaza la hipótesis nula debido a que el valor p que se calculó es menor que el nivel de significancia, tal como lo muestran las tablas 3.9 y 3.10.

Tabla 3.9 Variables útiles para análisis ANOVA

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F
Entre las muestras	6595.64	2	3297.82	9.32
Dentro de las muestras	4247.03	12	353.92	
Total	10842.67	14		

Tabla 3.10 Valor Crítico y p-valor

Valor crítico	3.89
p-valor	0.004

Empleando el método de Tukey se establece mediante la diferencia muestral si existe o no diferencias significativas entre las medias de los valores de actividades antioxidantes para cada par de variables analizadas tal como se ilustra en la tabla 3.11.

Tabla 3.11 Método de Tukey

Diferencia poblacional	Diferencial muestral	Decisión
$u_{orégano} - u_{tomillo}$	50.44	Si significativa
$u_{orégano} - u_{BHT}$	33.618	Si significativa
$u_{tomillo} - u_{BHT}$	16.821	No significativa

En relación con la decisión determinada para cada par de variables, se puede destacar que estadísticamente si hay diferencias significativas entre la media del orégano y el tomillo estableciendo que una de estas variables presenta una mejor media y por lo tanto sus valores son mayores. Es decir, que, analizando las actividades antioxidantes para ambas especies, se observa que el tomillo predomina significativamente que el orégano.

Por otra parte, al realizar la comparación de las medias para el orégano y el estándar (BHT) se determina que existen diferencias significativas entre ellas, es decir que una de estas variables presenta diferencias entre sus medias, estableciendo que una presenta valores más elevados de actividades antioxidantes que otros. Por lo que, en función a los resultados obtenidos se establece que el estándar presenta valores de actividades antioxidantes mayores que los del orégano, determinando que este no podría ser un buen reemplazo del antioxidante sintético.

Finalmente, realizando la comparación entre la media de las actividades antioxidantes del tomillo con el BHT muestra que no existen diferencias significativas entre sus medias, asegurando que estas presentan valores similares en sus actividades antioxidantes. Por lo tanto, dado a que según los datos obtenidos se observa una relación entre las actividades antioxidantes de estas muestras, sin embargo, se observa que el aceite esencial de tomillo a 500 ppm alcanza una actividad antioxidante del 98.77% la cual predomina sobre la del BHT a la misma concentración (500 ppm) es de 86.43%; estableciéndola como una especie con alta probabilidad para ser sustituida por el BHT en la industria.

3.6 Análisis económico

3.6.1 Producción de aceite esencial

Tomando en consideración los valores de rendimiento, tiempo de destilación y actividad antioxidante se puede determinar la especie más factible que se obtuvo como aceite esencial.

Refiriéndose a los rendimientos descritos en la tabla 3.2, el Orégano presentó un porcentaje menor (0.12%) en un tiempo total de destilación de 6 horas aproximadamente, considerando que su tiempo de secado también fue mayor con respecto al tomillo. Además, al evaluar su actividad antioxidante (35.96%), no podría ser sustituido libre del antioxidante sintético que obtuvo una actividad antioxidante del 86.43%. Por lo tanto, esta especie no sería la mejor opción para elaborar futuros bioproductos. La opción idónea en función a los factores mencionados anteriormente es el tomillo, dado a que presenta mayor

rendimiento, menor tiempo de destilación y secado y un valor alto de actividad antioxidante por encima del estándar.

Los costos de producción para el aceite esencial de tomillo se muestran en las tablas 3.12 y 3.13 donde se consideran el costo de la materia prima, los equipos y materiales. Por otra parte, para que se produzca el aceite de tomillo se necesitaría aproximadamente \$183.36 como inversión inicial, considerando que los equipos y materiales serán reutilizados, por lo que para la obtención de 4.7 mL de tomillo se debe invertir únicamente en la materia prima.

Tabla 3.12 Costo de proceso de extracción de aceite

Descripción	Precio
Olla de destilación	\$57.00
Mangueras PVC	\$7.62
Bomba de pecera	\$37.66
Tanque de gas	\$3.50
Cocineta a gas	\$25.00
Juego de soporte (abrazaderas, nueces y pinzas) y Trampa de Clevenger	\$40.58
Total	\$171.36

Tabla 3.13 Costo de materia prima y consumo de agua para 4.7 mL de producción

Materia Prima	Precio
Especie tomillo (11 lb)	\$12.00
Agua	\$0.43
Total	\$12.43

Tabla 3.14 Costo de producción para 5 mL de aceite esencial

Costo de producción para 5 mL de aceite esencial	\$13.22
Precio de venta (con una ganancia mínima del 30%)	\$17.19
Precio comercial	\$19.08

Como se puede observar en la tabla 3.13 y 3.14, el costo de producción para 4.7 mL de aceite esencial de tomillo es de \$12.43 y para 5 mL que es la cantidad mínima que se comercializa tendría un costo de \$13.22 respectivamente. Sin embargo, para obtener una ganancia mínima del 30% el costo debería ser de \$17.19. El precio comercial de este mismo aceite esencial a 5 mL es de \$19.08, por lo que empleando la metodología propuesta para extraer aceites esenciales es viable económicamente, y esto se debe a que con estas especificaciones logra obtener una alta actividad antioxidante (98.77%) con la finalidad de ser sustituto de un antioxidante sintético para emplearlo en la industria alimenticia, por lo que, este aceite esencial es una propuesta rentable dado a que se pueden utilizar los subproductos, como es el caso del hidrolato que también posee propiedades antioxidantes basándose en los resultados favorables del aceite.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

Con la finalidad de proponer posibles alternativas naturales que permitan reemplazar antioxidantes sintéticos en la industria alimentaria en un futuro, se implementó un método *in vitro* para determinar la actividad antioxidante de especies vegetales como *Origanum vulgare* (orégano) y *Thymus vulgaris* (tomillo) mediante el blanqueamiento de carotenoides en microplacas, concluyendo que:

- El aceite esencial del tomillo presentó mayor actividad antioxidante en comparación al orégano a 500 ppm con valores de Inhibición de blanqueo de 98.77% y 35.96% respectivamente. En relación con el patrón BHT con un poder inhibitorio de 86.43% obtenido experimentalmente, el tomillo obtuvo resultados superiores haciéndolo un posible sustituto. Los resultados obtenidos difieren con respecto a los estudios de referencia debido a que, la evaluación del poder inhibitorio depende de varios factores fisicoquímicos, como la concentración de las muestras, la temperatura y los solventes empleados.
- Mediante el análisis económico el cual garantiza la sustentabilidad del método, puesto a que el aceite esencial de tomillo es un potencial sustituto de calidad de antioxidantes sintéticos para la elaboración de productos en base a fuentes naturales, debido a su bajo costo de producción y efectiva actividad antioxidante. Además, se corroboró que, empleando cantidades mínimas de reactivos y solventes en microplacas para la implementación del método, se logran obtener actividades antioxidantes para el orégano, tomillo y BHT que superan los valores establecidos en las referencias, donde realizan un análisis empleando tubos de ensayo.
- Mediante el procesamiento estadístico de los resultados obtenidos, se verificó que existen diferencias significativas entre las medias de las actividades antioxidantes para las muestras, como indica el análisis ANOVA, en donde se obtuvo que el valor F es de 9.32 y comparándolo con el valor crítico mediante la distribución F, se rechaza la hipótesis nula. De la misma forma, se empleó el método de Tukey,

en el cual se puede destacar que estadísticamente si hay diferencias significativas entre la media del orégano y el tomillo, este último predominando en su %AA. Por último, se realizó la comparación entre el tomillo con el BHT, en donde a pesar de no haber diferencias significativas entre sus medias, el aceite esencial de tomillo a 500 ppm presenta mayor poder antioxidante que el sintético, haciéndolo un posible sustituto en la industria

4.2 Recomendaciones

- Se recomienda validar el método mediante los diferentes criterios como linealidad, precisión, variabilidad y límite de sensibilidad con la finalidad de demostrar que el procedimiento aplicado para evaluar la actividad antioxidante en microplacas es apto para el uso de ensayos futuros.
- Por otro lado, se recomienda realizar un análisis para establecer los rangos de tiempo para leer las absorbancias en el espectrofotómetro, con la finalidad de obtener la actividad antioxidante en función al tiempo de incubación.
- Se recomienda realizar comparaciones entre los aceites esenciales comerciales y los extraídos en la experimentación, con la finalidad de comprobar si la actividad antioxidante para ambos casos presenta similitud.
- En cuestión a la destilación, dado a que se obtuvieron cantidades significativas de hidrolatos para ambos aceites esenciales, se recomienda realizar análisis en función a la actividad antioxidante para demostrar si este puede ser útil en la implementación del método.
- Controlar los factores fisicoquímicos que pueden afectar directamente en la técnica como: la luz, la temperatura, el tiempo de evaporación, cantidad y tipo de agua implementada; con la finalidad de evitar pérdidas de muestras en la preparación de la emulsión y registrar valores erróneos de absorbancias en el lector de microplacas.

BIBLIOGRAFÍA

- Arango, O., Bolaños, F., Villota, O., Hurtado, A., & Toro, I. (2012). Optimización del rendimiento y contenido de timol de aceite esencial de orégano silvestre obtenido por arrastre con vapor. *Biotecnología en El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 10(2), 217–226.
- Arcila, C., Loarca, G., Lecona, S., & González, E. (2004). El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(1), 100–111.
- Arriola, G., & Monjaras, M. (2003). *Comprabación de pureza de los aceites comestibles de diferentes marcas comerciales en el area Metropolitana*. Universidad del Salvador.
- Auld Dsph, D, Coassin, P. S., & Coussens Npph, D. (2020). *Microplate Selection and Recommended Practices in High-throughput Screening and Quantitative Biology*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>
- Borboa, J. (2009). *Detección e incidencia de clavibacter michiganensissubespecie michiganensisen lycopersicon esculentummill.en el Estado de Sonora, México y evaluación del efecto bactericida de aceites esenciales*. Universidad Autónoma de Baja California.
- Borugă, O., Jianu, C., Mișcă, C., Goleț, I., Gruia, A. T., & Horhat, F. G. (2014). Thymus vulgaris essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of Medicine and Life*, 7 Spec No. 3, 56–60.
- Branen, A. L. (1975). Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 52(2), 59. <https://doi.org/10.1007/BF02901825>
- Burgos, J., & Calderon, F. (2009). *Determinación del contenido de carotenoides totales en ocho especies de frutas y verduras comercializadas en la zona metropolitana de San Salvador* [Universidad del Salvador].
- Burgos, Jessica., C. Fausto. (2009). *Determinación del contenido de carotenoides totales en ocho especies de frutas y verduras comercializadas en la zona metropolitana de San Salvador* [Bachelor Thesis, Universidad de El Salvador].

- Cáceres, M. B., Rozo, V. F., & del Valle García, E. (2021, July). Quality study of Oregano, Thyme and Rosemary essential oils cultivated in severino (El Carmen, Jujuy) collected during winter and spring. *Revista Científica de La Facultad de Ciencias Agrarias - UNJu*.
- Cano, T., Godínez, J., Quiñónez, B., & Barrientos, C. (2001). *Obtención y caracterización del aceite esencial de tomillo (Thymus vulgaris) cultivado en Guatemala, utilizado en diversidad de productos fitofarmacéuticos*. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Carranco Jáuregui, M. E., Calvo Carrillo, Ma. de la C., & Pérez-Gil Romo, F. (2011). Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 61(3), 233–241.
- Clavijo, M., & Comes, V. (2007). *Ficha de información técnica Tween*. <https://www.sefh.es/fichadjuntos/TWEEN80.pdf>
- Corella, R., & Ortega, M. (2013). Importancia del aceite esencial y la producción de orégano *Lippia palmeri* Watson en el Estado de Sonora. *BIOtecnia*, 15(1), 57. <https://doi.org/10.18633/bt.v15i1.137>
- Coronado, M., Vega, S., Gutiérrez, R., Vázquez, M., & Radilla, C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Rev Chil Nutr*, 42, 206.
- Crescenti, E. J. (2020, April 2). *¿Cómo afecta a nuestra salud el estrés oxidativo?* <https://www.crescenti.com.ar/novedad/salud-estres-oxidativo/>
- Dagnino, J. (2014). Análisis de varianza. *Rev Chil Anest*, 43(4), 306–310.
- Dawidowicz, A. L., & Olszowy, M. (2010). Influence of some experimental variables and matrix components in the determination of antioxidant properties by β -carotene bleaching assay: Experiments with BHT used as standard antioxidant. *European Food Research and Technology*, 231(6), 835–840. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1333-4>
- Dorman, H. J. D., & Hiltunen, R. (2004). Fe (III) reductive and free radical-scavenging properties of summer savory (*Satureja hortensis* L.) extract and subfractions. *Food Chemistry*, 88(2), 193–199. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.12.039>
- Eunice, G., Niño, A., Bourdon, A., & Guitierrez, D. I. (2016, June). Determination of Maximum Waves by Spectrum Sweep within an Ultraviolet-visible Spectral Region (UV-VIS). *Elementos*.

- Farmer. (2017). *Cosecha de Tomillo-Thymus*. <https://wikifarmer.com/es/cosecha-de-tomillo/>
- Fernández, G., García, F., Aparicio, F., & Sánchez, L. (2009). *Moléculas anfifílicas orgánicas. Auto-ensamblajes con morfología y dimensionalidad moduladas* (Vol. 105, Issue 2). www.rseq.org
- Flores, M. (2010). *Investigación de los aceites esenciales, sus características y finalidad de uso*. Universidad de Chile.
- Frankel, E. N. (1997). Nutritional Benefits of Flavonoids. In *Food Factors for Cancer Prevention* (pp. 613–616). Springer Japan. https://doi.org/10.1007/978-4-431-67017-9_121
- Fuller, David., B. Matías., F. Jorgue., A. Federico. (2010). *Aplicaciones del lector de microplacas en el laboratorio*. <https://www.cromtek.cl/2020/11/09/aplicaciones-del-lector-de-microplacas-en-ellaboratorio>.
- García, J., Castillo, A., Ramírez, M., Randón, G., & Larqué, M. (2001). A comparison of Tukey, Duncan, Dunnett, HSU and Bechhofer procedures for selection of means. *Agrociencia*, 35(1), 79–86. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30235107>
- Gil, S. (2021, December 30). *Método de secado industrial: ¿Cuál es el más adecuado?* <https://blog.somengil.com/es/metodos-de-secado-industrial-cual-es-el-mas-adecuado/>
- González, N. (2013). *Extracción y caracterización de los antioxidantes secundarios del Romero (Rosmarinus officinalis L.) para promover la obtención de antioxidantes naturales sobre grasas y aceites*. Universidad Técnica de Ambato.
- Guerra, L. (2011). *Evaluación de la actividad antimicrobiana y antioxidante de aceites esenciales de plantas usadas en medicina tradicional*. Universidad Autónoma de Buevo León.
- Hassan, Mahbub., Atiquzzaman, Mohammed., & Heredia, F. J. (2007). Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y fisicoquímicas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 57(2), 109–117.
- Hurst, J. W. (2002). Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals. In CRC Press (Ed.), *Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals* (2nd ed., Vol. 2, pp. 104–115).
- LabOlan. (2018). *Microplaca 96X0,2ml*. <https://www.labolan.es/es/producto/placa-96-pocillos-pcr-color-natural.html>

- Lina, L., Giraldo Vásquez, M., Luz, C., & Aristizabal, S. R. (2013). Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de *Palicourea guianensis* (Rubiaceae) Evaluation of antioxidant activity of *Palicourea guianensis* (Rubiaceae) extracts. In *Revista Cubana de Farmacia* (Vol. 47, Issue 4). <http://scielo.sld.cu><http://scielo.sld.cu>
- Llorens Molina, J. A. (2009). *Obtención de aceites esenciales mediante destilación por arrastre de vapor (equipo Clavenger)*. <https://riunet.upv.es:443/handle/10251/5707>
- Lopez, L. X., & García, H. S. (2008). Actividad antioxidante de extractos metanólicos y acuosos de distintas variedades de maíz mexicano. In *Nova scientia* (Vol. 2, Issue 3). Universidad De La Salle Bajío.
- López, R. M., Ruiz, L. M., & Delgadillo, J. (2016). Actividad antimicrobiana del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris* L.). *Agro productividad*, 9(11), 78–82.
- Loucif, K., Benabdallah, H., Benchikh, F., Mehlous, S., Souici, C. ben, & Amira, S. (2020) Total Phenolic Contents, DPPH Radical Scavenging and β -Carotene Bleaching Activities of Aqueous Extract from *Ammoides atlantica*. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 10(3-s), 196–198. <https://doi.org/10.22270/jddt.v10i3-s.4151>
- Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., & Lima, J. L. F. C. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613(1), 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.02.047>
- Meléndez, A., Vicario, I., & Heredia, F. (2007). Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y fisicoquímicas. *Organo Oficial de La Sociedad Latinoamericana de Nutrición*, 57(2).
- Munõz, Fernando. (1987). *Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y procesado*. Ediciones Mundi-Prensa.
- Naranjo, J. F., & Chávez, A. (2015). Análisis comparativo entre dos métodos de extracción de aceites esenciales semillero. *Qpf ud famarena*, 9(2), 15–19.
- Ndhlala, A. R., Moyo, M., & Staden, J. van. (2010). molecules Natural Antioxidants: ¿Fascinating or Mythical Biomolecules? *Molecules*, 15, 6905–6930. <https://doi.org/10.3390/molecules15106905>
- Paredes Adamary, P. J. (2019). *Influencia del estado de madurez en el índice de carotenoides del pimiento morrón (*Capsicum annuum*), utilizando visión artificial*. <https://1library.co/document/y4w18v0q-influencia-madurez-indice-carotenoides-pimiento-capsicum-utilizando-artificial.html>

- Plant. (2011, May 1). *Orégano – Planta Aromática – Usos y características*. https://casa-web.com.ar/oregano_711
- Prez, D., Leieghton, F., Aspee, A., Aliaga, C., & Lissi, E. (2000). A comparison of methods employed to evaluate antioxidant capabilities. *Biological Research*, 33(2). <https://doi.org/10.4067/S0716-97602000000200006>
- Prieto, M. A., Rodríguez-Amado, I., Vázquez, J. A., & Murado, M. A. (2012). β -Carotene Assay Revisited. Application To Characterize and Quantify Antioxidant and Prooxidant Activities in a Microplate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 8983–8993. <https://doi.org/10.1021/jf302218g>
- Quintana López, A., Ángel, M., Oliva, H., Hernández, C., & Mechetnov, E. P. (2018). Carotenoides. ¿Qué son y para qué se usan? *Revista Ciencia*, 69(4).
- Quiroz Velásquez, J. D. C., Sánchez Várela, A., Torres Ortega, J. A., García Olivares, J. G., Salazar Bravo, Á., & Hernández Mendoza, J. L. (2017). Cuantificación por HPLC del Contenido de Timol y Carvacrol en *Lippia Graveolens* HBK s.l., Nativa de Reynosa, Tamaulipas, México. *Revista Boliviana de Química*, 34(1), 33–39. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0250-54602017000100005&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Reyes Peter, & León Claudia. (2017). *Estandarización de la técnica blanqueamiento del betacaroteno para la evaluación de la actividad antioxidante de extractos lipofílicos: plantas medicinales, frutos y microalgas*. Universidad de Cuenca.
- Rodrigo, J. A. (2016, January). *Anova análisis de varianza para comparar múltiples medias*. https://www.cienciadedatos.net/documentos/19_anova
- Rota, M. C., Herrera, A., Martínez, R. M., Sotomayor, J. A., & Jordán, M. J. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*, 19(7), 681–687. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.07.007>
- Sánchez, M., M. M., D. G. (1993). Farmacia galénica. In *Tratado de Farmacia Galénica*. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1489§ionid=96949506>
- Soler, A. (2009). *Estudio de la capacidad antioxidante y biodisponibilidad de los compuestos fenólicos del aceite de oliva*. Universidad de Lleida.
- Unsimá. (2019, June 15). *Tomillo: Contraindicaciones, propiedades y beneficios*. <https://unisima.com/salud/tomillo/>

Vargas C, E., & Vargas C, E. (2013). *Medición de la potencia de pruebas de comparación múltiple de medias para experimentos desbalanceados con el uso de simulación de muestras*. Universidad de Carabobo.

Vásquez, D. (2012). *El orégano de monte (Lippia origanoides) del Alto Patía: Efecto del método de obtención de sus extractos sobre la composición y la actividad antioxidante de los mismos*. Universidad Nacional de Colombia.

Zamora S., J. D. (2007). Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. *Revista Chilena de Nutrición*, 34(1). <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46934102>

APÉNDICE

APÉNDICE A

A.1 Ecuación de rendimiento de aceites esenciales

Para obtener el rendimiento de la destilación se consideró la cantidad de materia prima suministrada en el proceso y el peso del aceite esencial

$$\%R = \frac{m_{aceiteOB}}{m_{materiaP}} * 100 \quad (\text{Ec.5})$$

$\%R$: Rendimiento porcentaje

$m_{aceiteOB}$: Masa de aceite esencial obtenida

$m_{materiaP}$: Masa de materia prima suministrados

APÉNDICE B

B.1 Concentraciones y absorbancia del Estándar BHT y aceites esenciales a 0 min

Conc.	ACEITE DE ORÉGANO			ACEITE DE TOMILLO			BHT		
500	0,21	0,214	0,211	0,21	0,222	0,22	0,21	0,231	0,229
250	0,218	0,208	0,224	0,218	0,222	0,222	0,225	0,225	0,224
125	0,21	0,216	0,214	0,214	0,221	0,217	0,22	0,219	0,219
62,5	0,214	0,201	0,321	0,21	0,212	0,215	0,222	0,219	0,21
31,25	0,23	0,221	0,215	0,208	0,218	0,215	0,22	0,218	0,222
15,625				0,211	0,214	0,221	0,218	0,222	0,288
7,8125				0,207	0,223	0,21	0,213	0,214	0,215
3,90625				0,214	0,216	0,213	0,216	0,212	0,212

B.2 Lectura de absorbancia por triplicado del blanco y control negativo a 0 min

BLANCO	0,047	0,046	0,046
CONTROL -	0,227	0,293	0,256
CONTROL -	0,254	0,253	0,232

B.3 Concentraciones y absorbancia del Estándar BHT y aceites esenciales a 60 min

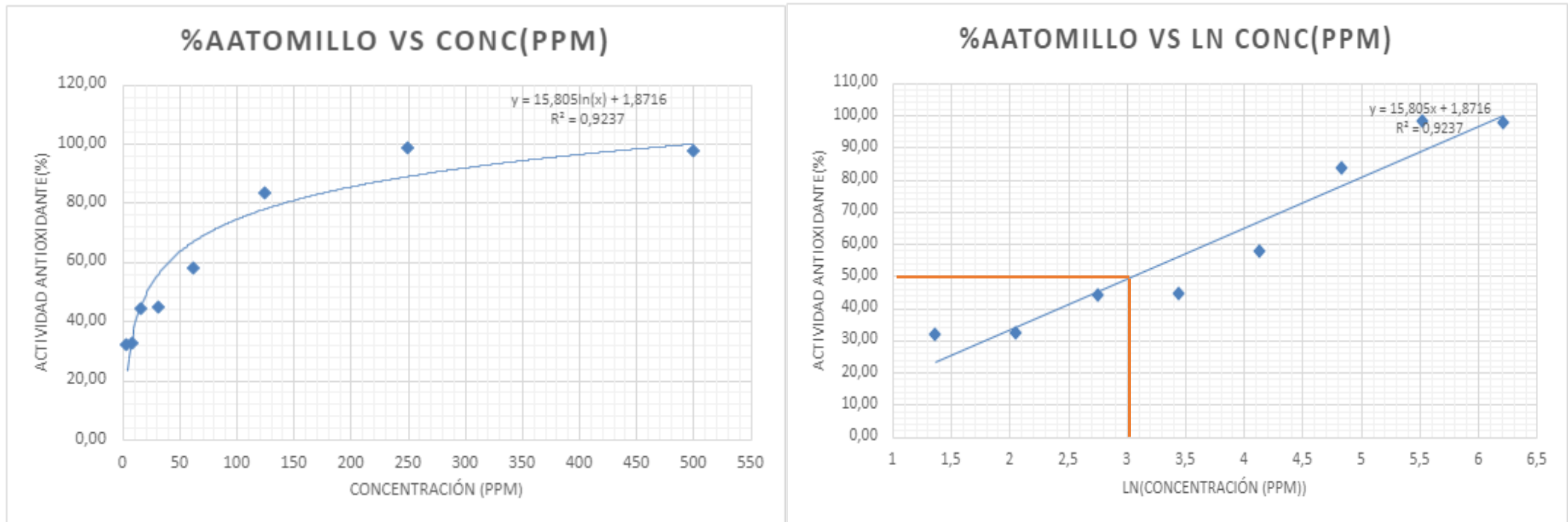
Conc.	ACEITE DE ORÉGANO			ACEITE DE TOMILLO			BHT		
500	0,147	0,158	0,159	0,216	0,203	0,219	0,215	0,204	0,2
250	0,141	0,153	0,153	0,217	0,22	0,213	0,21	0,196	0,175
125	0,149	0,15	0,152	0,194	0,202	0,199	0,194	0,171	0,178
62,5	0,142	0,145	0,152	0,172	0,17	0,173	0,176	0,164	0,149
31,25	0,146	0,153	0,148	0,163	0,164	0,161	0,175	0,157	0,149
15,625				0,165	0,164	0,161	0,174	0,169	0,132
7,8125				0,153	0,153	0,155	0,165	0,138	0,115
3,90625				0,152	0,154	0,156	0,152	0,132	0,154

B.4 Lectura de absorbancia por triplicado del blanco y control negativo a 60 min

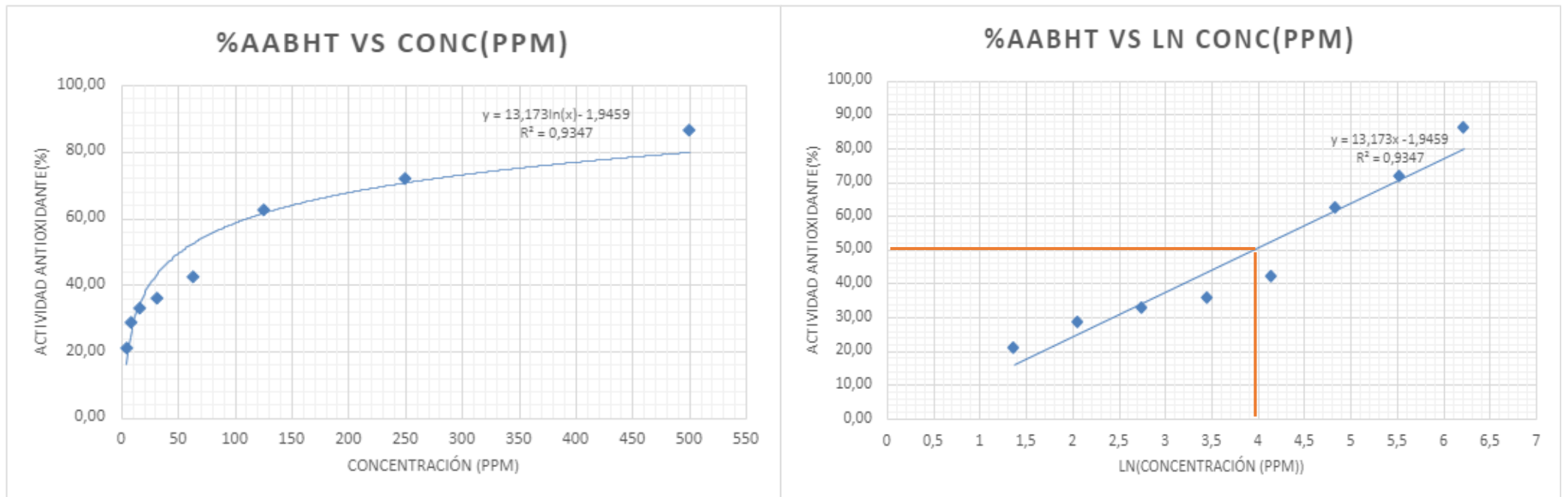
BLANCO	0,044	0,044	0,043
CONTROL -	0,172	0,168	0,165
CONTROL -	0,135	0,142	0,144

APÉNDICE C

C.1 Gráficas para el Cálculo del IC50 de Tomillo



C.2 Gráficas para el Cálculo del IC50 de BTH



APÉNDICE D

D.1 Análisis de varianza de las muestras

Ho: las medias de las AA de cada muestra son iguales

Hi: las medias de las AA de cada muestra no son iguales

CONCEN	OREGANO	TOMILLO	BHT
500	35,96	98,11	86,43
250	22,75	98,77	72,19
125	27,95	83,86	62,89
62,5	27,52	58,22	42,49
31,25	17,79	45,21	36,06
Suma (xi)	131,97	384,17	300,06
Media	26,39	76,83	60,01
Suma Total(x)	816,20		
ni	5	5	5
N	15		
k	3		
SCtrat	6595,64		
SCTotal	10842,67		
SCError	4247,03		

D.2 Resumen (ANOVA)

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Oregano	5	131,9680461	26,39360922	45,6101385
Tomillo	5	384,1691843	76,83383686	582,385611
Bht	5	300,0594068	60,01188136	433,760948

D.3 Análisis de datos (ANOVA)

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	6595,63828	2	3297,81914	9,3180080	0,00361155	3,8852938
Dentro de los grupos	4247,02679	12	353,918899			
Total	10842,6650	14				

D.4 Variables de Método Tukey

Método de Tukey	
k	3
N-k	12
Cme	353,9188994
ni	5
q(k,N-k)	3,77
Ta	31,71817752

D.5 Cuantiles de la distribución de Tukey $q(n,m)$

$\alpha = 0.05$	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
m														
2	6.08	8.33	9.80	10.88	11.73	12.43	13.03	13.54	13.99	14.40	14.76	15.09	15.39	15.67
3	4.50	5.91	6.82	7.50	8.04	8.48	8.85	9.18	9.46	9.72	9.95	10.15	10.35	10.52
4	3.93	5.04	5.76	6.29	6.71	7.05	7.35	7.60	7.83	8.03	8.21	8.37	8.52	8.66
5	3.64	4.60	5.22	5.67	6.03	6.33	6.58	6.80	6.99	7.17	7.32	7.47	7.60	7.72
6	3.46	4.34	4.90	5.30	5.63	5.90	6.12	6.32	6.49	6.65	6.79	6.92	7.03	7.14
7	3.34	4.16	4.68	5.06	5.36	5.61	5.82	6.00	6.16	6.30	6.43	6.55	6.66	6.76
8	3.26	4.04	4.53	4.89	5.17	5.40	5.60	5.77	5.92	6.05	6.18	6.29	6.39	6.48
9	3.20	3.95	4.41	4.76	5.02	5.24	5.43	5.59	5.74	5.87	5.98	6.09	6.19	6.28
10	3.15	3.88	4.33	4.65	4.91	5.12	5.30	5.46	5.60	5.72	5.83	5.93	6.03	6.11
11	3.11	3.82	4.26	4.57	4.82	5.03	5.20	5.35	5.49	5.61	5.71	5.81	5.90	5.98
12	3.08	3.77	4.20	4.51	4.75	4.95	5.12	5.27	5.39	5.51	5.61	5.71	5.80	5.88
13	3.06	3.75	4.15	4.45	4.69	4.88	5.05	5.19	5.32	5.43	5.53	5.63	5.71	5.79
14	3.03	3.70	4.11	4.41	4.64	4.83	4.99	5.13	5.25	5.36	5.46	5.55	5.64	5.71
15	3.01	3.67	4.08	4.37	4.59	4.78	4.94	5.08	5.20	5.31	5.40	5.49	5.57	5.65
16	3.00	3.65	4.05	4.33	4.56	4.74	4.90	5.03	5.15	5.26	5.35	5.44	5.52	5.59
17	2.98	3.63	4.02	4.30	4.52	4.70	4.86	4.99	5.11	5.21	5.31	5.39	5.47	5.54
18	2.97	3.61	4.00	4.28	4.49	4.67	4.82	4.96	5.07	5.17	5.27	5.35	5.43	5.50
19	2.96	3.59	3.98	4.25	4.47	4.65	4.79	4.92	5.04	5.14	5.23	5.31	5.39	5.46
20	2.95	3.58	3.96	4.23	4.45	4.62	4.77	4.90	5.01	5.11	5.20	5.28	5.36	5.43
21	2.94	3.56	3.94	4.21	4.42	4.60	4.74	4.87	4.98	5.08	5.17	5.25	5.33	5.40
22	2.93	3.55	3.93	4.20	4.41	4.58	4.72	4.85	4.96	5.06	5.14	5.23	5.30	5.37
23	2.93	3.54	3.91	4.18	4.39	4.56	4.70	4.83	4.94	5.03	5.12	5.20	5.27	5.34
24	2.92	3.53	3.90	4.17	4.37	4.54	4.68	4.81	4.92	5.01	5.10	5.18	5.25	5.32
25	2.91	3.52	3.89	4.15	4.36	4.53	4.67	4.79	4.90	4.99	5.08	5.16	5.23	5.30
26	2.91	3.51	3.88	4.14	4.35	4.51	4.65	4.77	4.88	4.98	5.06	5.14	5.21	5.28
27	2.90	3.51	3.87	4.13	4.33	4.50	4.64	4.76	4.86	4.96	5.04	5.12	5.19	5.26
28	2.90	3.50	3.86	4.12	4.32	4.49	4.62	4.74	4.85	4.94	5.03	5.11	5.18	5.24
29	2.89	3.49	3.85	4.11	4.31	4.47	4.61	4.73	4.84	4.93	5.01	5.09	5.16	5.23
30	2.89	3.49	3.85	4.10	4.30	4.46	4.60	4.72	4.82	4.92	5.00	5.08	5.15	5.21
31	2.88	3.48	3.84	4.09	4.29	4.45	4.59	4.71	4.81	4.90	4.99	5.06	5.13	5.20
32	2.88	3.48	3.83	4.09	4.28	4.45	4.58	4.70	4.80	4.89	4.98	5.05	5.12	5.18
33	2.88	3.47	3.83	4.08	4.28	4.44	4.57	4.69	4.79	4.88	4.97	5.04	5.11	5.17
34	2.87	3.47	3.82	4.07	4.27	4.43	4.56	4.68	4.78	4.87	4.96	5.03	5.10	5.16
35	2.87	3.46	3.81	4.07	4.26	4.42	4.56	4.67	4.77	4.86	4.95	5.02	5.09	5.15

