

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



Extracción, caracterización, evaluación de la capacidad antioxidante y de inhibición antibacteriana del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) y su respectivo hidrolato mediante el uso de métodos tradicionales, enzimáticos y ultrasonido.

Trabajo de graduación presentado por Carlos Rodrigo Choxom Cojom para optar por el grado académico de Licenciado en Ingeniería en Ciencias de Alimentos.

Guatemala,

2023

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



Extracción, caracterización, evaluación de la capacidad antioxidante y de inhibición antibacteriana del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) y su respectivo hidrolato mediante el uso métodos de tradicionales, enzimáticos y ultrasonido.

Trabajo de graduación presentado por Carlos Rodrigo Choxom Cojom para optar por el grado académico de Licenciado en Ingeniería en Ciencias de Alimentos.

Guatemala,

2023

Vo. Bo.



(Msc. Ana Silvia Colmenares de Ruiz)

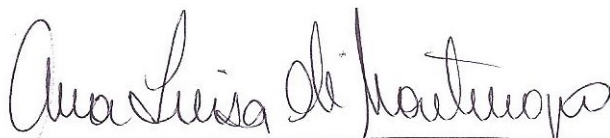
Tribunal examinador



Msc. Ana Silvia Colmenares de Ruiz



Msc. Ana Alicia Paz Pierri



Lcda. Ana Luisa Mendizábal Solé

Fecha de aprobación del examen de graduación:

(Guatemala, 6 de diciembre de 2023).

Prefacio

Dedico este trabajo principalmente a Dios por darme la oportunidad de concluir mis estudios universitarios de manera tan especial como lo han sido estos cinco años llenos de aprendizajes y experiencias. Lleno de alegría también agradezco a la Virgen el poder darme la satisfacción de haber concluido una etapa más, por darme la sabiduría, fuerza e inteligencia para poder salir adelante cada día. Agradezco a:

A mis papás:

Gracias por brindarme amor y apoyo siempre en cada uno de mis pasos, el camino nunca fue fácil, pero de la mano de ustedes conseguí alcanzar mis metas hasta el momento, gracias porque nunca me presionaron ni negaron mis metas y sueños que me propuse desde el primer día. Les agradezco infinitamente porque durante todo este tiempo nunca me ha faltado andá y hasta tenido de más, por eso y más cosas les agradezco siempre.

A mis hermanos Jimena y Kevin

Gracias por siempre ser un apoyo incondicional para mí y darme ánimos cuando me veía cansado o estresado en la universidad, gracias por siempre animarme y darme ánimos en mis logros por más pequeños que fueran, por mostrar siempre interés en mis proyectos y ser fuente de inspiración para mí.

A mis abuelitos

Muchas gracias por todos los consejos y el amor brindado durante tanto tiempo, por las anécdotas contadas y por transmitirme su alegría en cada plática que hemos tenido, gracias por enseñarme que con trabajo duro y esfuerzo todo lo que me proponga es posible.

A Sara

Te agradezco eternamente por estar conmigo en cada etapa del trabajo y brindarme tu apoyo incondicional, me alegra mucho saber que la alegría que tenemos el uno por el otro en cada logro obtenido es mutua y que contamos y tenemos fe siempre el uno por el otro.

A Lic. Jorge Mazariegos:

Por abrirme las puertas, ayudarme y aconsejarme en las partes más difíciles de este trabajo, muchas gracias por toda la ayuda que me brindó en este trabajo de graduación, y por compartir todo su conocimiento conmigo.

A Lic. Víctor Hugo Jiménez

Por apoyarme en la parte microbiológica de este proyecto y por compartir todo el conocimiento y la confianza brindada durante la etapa del proyecto y por brindarme el tiempo para transferir todo el conocimiento posible.

A Msc. Ana Silvia Colmenares

Gracias por recibirme como tesista y brindarme todo el apoyo posible y por el tiempo en cada duda que surgía. Muchas gracias por la dedicación brindada que fueron esenciales en esta etapa de la carrera.

Al proyecto ASPIRE

Por aceptarme como parte de tan gran proyecto facilitándome el trabajo teórico como experimental y abrir mi mente hacia el conocimiento en cada etapa del proyecto.

Índice

<i>Prefacio</i>	V
<i>Listado de figuras</i>	IX
<i>Lista de tablas</i>	X
<i>Resumen</i>	XII
I. Introducción	1
II. Marco teórico y antecedentes	3
A. Aceites esenciales	3
1. Clasificación de los aceites esenciales	3
2. Características	4
3. Composición.....	4
4. Agua floral o hidrolato.....	4
B. Métodos empleados para la extracción de aceites esenciales	5
1. Arrastre de vapor	5
2. Destilación con agua	5
3. Hidrofusión	5
4. Combinación de destilación y maceración.....	6
5. Extracción con solventes	6
6. Extracción mediante solventes volátiles.....	6
7. Extracción mediante solventes fijos	6
8. Hidrodestilación.....	7
9. Fluidos supercríticos.....	7
10. Prensado en frío	8
C. Factores que afectan al rendimiento en las extracciones	8
1. Rendimiento de aceites esenciales	8
2. Tipo de materia prima	8
3. Tiempo de secado.....	8
4. Tamaño de partícula	9
5. Tiempo de extracción	9
6. Método de extracción	9
7. Presión	9
8. Temperatura	9
9. Contenido de humedad	10
10. Efecto del pretratamiento.....	10
D. Capacidad antioxidante de los aceites esenciales	10
1. Antioxidantes	11
2. Métodos analíticos para la cuantificación de la capacidad antioxidante	11
3. DPPH	11
E. Capacidad de inhibición antibacteriana de los aceites esenciales	12
1. <i>E. Coli</i> en alimentos	12
2. <i>Salmonella</i> en alimentos	13
F. Métodos para la mejora en la extracción de aceites esenciales	13
1. Métodos enzimáticos.....	13
2. Métodos mediante el uso de ultrasonidos	16

G.	Aceite esencial de tomillo	20
1.	Tomillo.....	20
2.	Aceite esencial de tomillo.	21
3.	Caracterización del aceite esencial de tomillo.	23
4.	Aplicaciones del aceite esencial de tomillo.....	23
5.	Producción de aceite esencial.....	24
III.	Justificación.....	25
IV.	Objetivos	27
A.	General	27
B.	Específicos.....	27
V.	Metodología (materiales y métodos)	28
A.	Fase 1	28
	Preparación de la muestra.....	28
	Extracción de aceite esencial de tomillo mediante la destilación por arrastre de vapor.....	28
	Extracción de aceite esencial de tomillo mediante uso métodos enzimáticos	29
	Extracción de aceite esencial de tomillo mediante uso de ultrasonidos	30
B.	Fase 2	30
	Caracterización del aceite esencial de tomillo e hidrolato.	30
C.	Fase 3	33
	Análisis estadístico de los resultados entre el aceite esencial de tomillo y el respectivo hidrolato .	33
VI.	Resultados y discusión.....	34
VII.	Conclusiones	42
VIII.	Recomendaciones	43
IX.	Bibliografía	44
X.	Anexos	48

Listado de figuras

Figura 1. Mecanismos de hidrólisis catalítica.	15
Figura 2. Comparativa de molecular sin trata(A) y tratada (B) con ultrasonido.	20
Figura 3. Destilación por arrastre de vapor en alambique de laboratorio.	29
Figura 4. Enzimas utilizadas para la extracción con pretratamiento enzimático.	29
Figura 5. Extracción de aceite esencial de tomillo con pretratamiento enzimático.	30
Figura 6. Analisis de inhibición antibacterina realizado para las muestras de aceite esencial de tomillo y su respectivo hidrolato.	32
Figura 7. Analisis por DPPH de la capacidad antioxidante del aceite esencial de tomillo.	33
Figura 8. Curva de calibración para el análisis de antioxidantes del aceite esencial de tomillo obtenido por arrastre de vapor.	50
Figura 9. Curva de calibración para el duplicado análisis de antioxidantes del aceite esencial de tomillo obtenido por arrastre de vapor.	51
Figura 10. Curva de calibración para el análisis de antioxidantes del aceite esencial de tomillo obtenido por arrastre de vapor con método enzimático.	52
Figura 11. Curva de calibración del duplicado para el análisis de antioxidantes del aceite esencial de tomillo obtenido por arrastre de vapor con método enzimático.	53
Figura 12. Cromatograma para el aceite esencial de tomillo obtenido por arrastre de vapor.	57
Figura 13. Cromatograma para el aceite esencial de tomillo obtenido por arrastre de vapor con método enzimático.	58
Figura 14. Cromatograma para el hidrolato de tomillo obtenido por arrastre de vapor. ...	59
Figura 15. Cromatograma para el hidrolato de tomillo obtenido por arrastre de vapor con método enzimático.	60
Figura 16. Extracción del aceite esencial de tomillo por arrastre de vapor.	61
Figura 17. Aceite esencial de tomillo recolectado.	61
Figura 18. Enzima utilizada para la extracción del aceite esencial de tomillo.	61
Figura 19. Aceite esencial obtenido mediante el uso del método enzimático.	62
Figura 20. Determinación de la densidad del aceite esencial de tomillo.	62
Figura 21. Análisis de antioxidantes para el aceite esencial de tomillo.	62
Figura 22. Recuento de colonias para la cepa E.coli.	63
Figura 23. Recuento de colonias para la cepa Salmonella.	63
Figura 24. Análisis de inhibición antibacteriana del aceite esencial de tomillo y de respectivo hidrolato.	63

Lista de tablas

Tabla 1. Extracción de flavonoides en <i>Saussurea medusa</i> Maxim, utilizado distintos métodos tradicionales y no tradicionales.....	18
Tabla 2. Extracción de alcaloides por distintos métodos a partir de <i>H. muticus</i>	18
Tabla 3. Principales componentes del aceite esencial de tomillo.	23
Tabla 4. Evaluación sensorial del aceite de tomillo.	23
Tabla 5. Características fisicoquímicas del aceite esencial de tomillo.	23
Tabla 6. Rendimientos y fracciones extraídas en las destilaciones de aceite esencial de tomillo extraídas por arrastre de vapor con y sin tratamiento enzimático.	34
Tabla 7. Prueba T para las extracciones de aceite esencial de tomillo.	34
Tabla 8. Caracterización del aceite esencial de tomillo obtenido mediante arrastre de vapor.	36
Tabla 9. Caracterización del aceite esencial de tomillo obtenido mediante arrastre de vapor asistido por enzimas.	37
Tabla 10. Caracterización del hidrolato de tomillo obtenido mediante arrastre de vapor...	37
Tabla 11. Caracterización del hidrolato de tomillo obtenido mediante arrastre de vapor asistido por enzimas.	37
Tabla 12. Capacidad antioxidante media del aceite esencial de tomillo obtenido mediante la destilación por arrastre de vapor con y sin método enzimático.	38
Tabla 13. Prueba T para la capacidad antioxidante de aceite esencial de tomillo obtenido.	38
Tabla 14. Índice de refracción del aceite esencial de tomillo.	39
Tabla 15. Prueba T para el índice de refracción del aceite esencial de tomillo obtenido. ..	39
Tabla 16. Densidad del aceite esencial de tomillo.....	40
Tabla 17. Prueba T para la densidad del aceite esencial de tomillo obtenido.....	40
Tabla 18. Factores de dilución de inhibición antibacteriana para patógenos <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i>	40
Tabla 19. Extracción de aceite esencial de tomillo mediante arrastre de vapor.	48
Tabla 20. Extracción de aceite esencial de tomillo mediante arrastre de vapor con método enzimático.	48
Tabla 21. Índice de refracción del aceite esencial de tomillo recolectado.....	48
Tabla 22. Densidad del aceite esencial de tomillo recolectado.....	49
Tabla 23. IC50 para antioxidantes del aceite esencial de tomillo recolectado.....	49
Tabla 24. Resultado para la capacidad antioxidante del aceite esencial de tomillo obtenido por arrastre de vapor.....	49
Tabla 25. Resultado del duplicado para la capacidad antioxidante del aceite esencial de tomillo obtenido por arrastre de vapor.	50
Tabla 26. Resultado para la capacidad antioxidante del aceite esencial de tomillo obtenido por arrastre de vapor con método enzimático.....	51
Tabla 27. Resultado del duplicado para la capacidad antioxidante del aceite esencial de tomillo obtenido por arrastre de vapor con método enzimático.	52
Tabla 28. Concentración de las cepas utilizadas en las placas de Elisa para la actividad antibacteriana.	53
Tabla 29. Factores de dilución de inhibición antibacteriana para <i>E.coli</i>	53

Tabla 30. Factores de dilución de inhibición antibacteriana para Salmonella.	54
Tabla 31. Absorbancias a distintos factores de dilución para la inhibición antibacteriana de Salmonella y E.coli para el aceite esencial de tomillo obtenido y respectivo hidrolato.	54
Tabla 32. Resultado de la prueba T para los resultados de extracción de ambos métodos evaluados en el aceite esencial de tomillo.	55
Tabla 33. Resultado de la prueba T para el índice de refracción del aceite esencial de tomillo recolectado.	55
Tabla 34. Resultado de la prueba T para la densidad del aceite esencial de tomillo recolectado.	56
Tabla 35. Resultado de la prueba T para la capacidad antioxidante del aceite esencial de tomillo recolectado.	56

Resumen

Durante este trabajo se llevaron a cabo distintas pruebas para la extracción de aceite esencial de tomillo utilizando diferentes métodos. Inicialmente se realizó destilaciones por arrastre de vapor para determinar los rendimientos de extracción en dicha matriz vegetal, luego se introdujo un tratamiento enzimático previo a la extracción por arrastre de vapor utilizando al enzima Viscozyme L en donde se obtuvo una diferencia significativa positiva para el rendimiento de extracción de los aceites esenciales de tomillo recolectados. También se realizaron pruebas de extracción utilizando un tratamiento ultrasónico seguido por una hidrodestilación en donde por la matriz utilizada no se lograron obtener resultados cuantificables. La caracterización del aceite esencial de tomillo tanto con y sin el método enzimático se realizó mediante cromatografía de gases asistida por un detector de masas, se obtuvo que los compuestos predominantes fueron el timol, carvacrol y p-cimeno, compuestos responsables de las características del aceite esencial de tomillo; en cuanto a los hidrolatos se determinó que estos estaban compuestos principalmente por agua y una mínima cantidad de timol.

También, se evaluó la capacidad antioxidante de los aceites esenciales extraídos en donde para el aceite esencial extraído por arrastre de vapor resulto ser baja siendo esta de 100.949 ± 3.43 , pero la capacidad para el aceite esencial obtenido con el método enzimático resulto ser el doble de baja siendo de 201.53 ± 4.80 , debido a la presencia de las enzimas que pudieron haber afectado a los componentes antioxidantes del aceite esencial. De igual manera se evaluaron las características fisicoquímicas de los aceites esenciales obtenidos siendo la densidad y el índice de refracción que estuvieron dentro del rango teórico aceptado, indicando que la pureza de los aceites se pudo considerar alta y sin adulteraciones. Finalmente, se evaluó la capacidad de inhibición antibacteriana contra patógenos como *E.coli* y *Salmonella* en donde se encontró que el aceite esencial de tomillo con y sin un tratamiento enzimático además de los hidrolatos resultaron tener una buena capacidad de inhibición antibacteriana para dichos patógenos, en especial para la cepa de *Salmonella* teniendo una inhibición hasta llegar a una dilución 1:64 y 1:32 para *Salmonella* en una concentración de $4.56E+6$ UFC/ml y una dilución 1:128 para *E.coli* en una concentración de $2.54E+5$ UFC/ml.

I. Introducción

Los aceites esenciales son productos obtenidos a partir de una materia prima natural que sea de origen vegetal. Estos pudiéndose clasificar con base en diferentes criterios como su consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios. Los aceites esenciales no son sustancias puras sino una mezcla compleja de compuestos orgánicos volátiles de carácter aromático que se pueden encontrar en una gran variedad de familias de plantas, normalmente las plantas más usadas para la obtención de aceites esenciales contienen de media en torno al 0.5 – 5% en masa de aceite respecto a toda la planta. Ahora bien, en cuanto a su composición, los aceites esenciales son mezclas de elevada complejidad ya que están principalmente constituidos por terpenos que son un grupo de hidrocarburos inodoros que contribuyen muy poco al aroma y actúan como diluyente del aceite esencial (Antezana, 2022).

El residuo que queda de la extracción del aceite esencial se conoce como hidrolato o agua floral; esta es formada por la condensación del vapor que ha atravesado la materia prima durante el proceso de destilación por arrastre de vapor. El hidrolato luego de la destilación puede ser útil para riegos o a través del sistema de cohobación, puede utilizarse en el mismo sistema de destilación de aceites. El método más utilizado para la extracción de aceite esencial suele ser la destilación por arrastre de vapor pues esta se lleva a cabo con la vaporización selectiva del componente volátil de una mezcla formada por este y otros compuestos no volátiles. En la destilación por arrastre de vapor es posible utilizar un gas para el arrastre y el comportamiento que tendrá la temperatura a lo largo de la destilación será constante, ya que no existen cambios en la presión de vapor o en la composición de vapores de la mezcla, es decir que el punto de ebullición permanece constante en uno de los líquidos (Cáceres, 2021).

Existen una gran variedad de métodos previos a las destilaciones de aceites esenciales que permiten tener un incremento en los rendimientos de extracción como lo son los métodos enzimáticos o los métodos con el uso de ultrasonido que permiten la destrucción de las membranas celulares de la materia vegetal permitiendo tener un incremento en el rendimiento de extracción de los aceites esenciales.

El tomillo (*Thymus vulgaris*) pertenece a la familia de las labiadas, que crece espontáneamente por todo el sur de Europa, ya sea por semillas o más frecuentemente por división de las matas en primavera. El aceite esencial de tomillo se extrae mediante un proceso de destilación de las partes aéreas de la planta y su componente principal es el timol que contiene propiedades medicinales sobresalientes. Actualmente está comprobado que los componentes fenólicos del tomillo como el timol y carvacrol tiene actividad antibacteriana frente a bacterias gram positivas y gram negativas. Dicha actividad se debe a su acción sobre la membrana bacteriana. El agente activo del tomillo que es el timol se caracteriza por su poder desinfectante y fungicida; por su sabor agradable está presente en la formulación de diversos enjuagues bucales, pastas de dientes, entre otros productos (Gavrila, 2023).

Finalmente, el aceite esencial de tomillo se utiliza en la industria de alimentos como un aditivo para la comida de pollo en el engorde de estos sin que la calidad de la carne se vea afectada. También, en la industria agroalimentaria el aceite esencial de tomillo es utilizado como un conservador de carnes. Pero también en la industria farmacéutica es utilizado en la elaboración de medicamentos por sus propiedades funcionales.

El análisis en las extracciones del aceite esencial de tomillo es de suma importancia ya que al ser un aceite con una variedad de aplicaciones en la industria se desea obtener el mayor rendimiento de extracción posible. Por ello la experimentación con enzimas y con vibración ultrasónica para la evaluación de la mejora en el rendimiento de extracción es importante. Además, que con el aceite esencial obtenido es de gran importancia analizar las características físicoquímicas del mismo como lo es el índice de refracción y la densidad, pero también la evaluación de las características de cada aceite es esencial como la capacidad antioxidante por medio de la espectrofotometría con el uso de DPPH es útil para determinar si es buen agente antioxidante. Por otro lado, identificar la capacidad de inhibición antibacteriana es sumamente importante ya que esta se utiliza para identificar el potencial de usar los aceites esenciales como agentes antibacterianos en alimentos, y dicha medición se realiza con la evaluación de diluciones en placas de Elisa con el uso de absorbancias en los aceites y en los hidrolatos. Finalmente, la caracterización de los aceites esenciales es de gran importancia para identificar los compuestos volátiles presentes en los aceites, por medio de la cromatografía de gases.

II. Marco teórico y antecedentes

A. Aceites esenciales

Según la Organización Internacional de Normalización (ISO), los aceites esenciales se definen como el producto obtenido a partir de una materia prima natural de origen vegetal, por destilación con vapor de agua, por procesos mecánicos del epicarpio de los frutos críticos o por destilación seca, después de la separación de la fase acuosa, si la hubiera, mediante procesos físicos (ISO, 2013).

1. Clasificación de los aceites esenciales

Los aceites esenciales se pueden clasificar con base en diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios.

Consistencia: De acuerdo con su consistencia los aceites esenciales se clasifican en:

- Esencias: son líquidos volátiles a temperatura ambiente.
- Bálsamos: son extractos naturales obtenidos de un arbusto o un árbol, se caracterizan por tener un alto contenido de ácido benzoico y cinámico, así como sus correspondientes esteres. Son de consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización.
- Resinas: son productos amorfos sólido o semisólidos de naturaleza química compleja, pueden ser de origen fisiológico o fisiopatológico.

(Antezana Ruiz, 2017).

Origen: De acuerdo con su origen los aceites esenciales se clasifican como:

- Naturales: se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas y químicas posteriores, debido a su rendimiento tan bajo son muy costosas.
- Artificiales: se obtienen a través de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes, por ejemplo, la mezcla de esencias de risa, geranio y jazmín, enriquecida con linalol, o la esencia de anís enriquecida con anetol.
- Sintéticos: son los producidos por la combinación de sus componentes los cuales son la mayoría de las veces producidos por procesos de síntesis química.

(Antezana Ruiz, 2017).

Naturaleza química:

Según la estructura química de los componentes mayoritarios que determinan el olor particular de los aceites, estos se dividen en tres grupos principales:

- Mono terpenoides
- Sesquiterpenoides
- Compuestos oxigenados

(Antezana Ruiz, 2017).

2. Características

Los aceites esenciales no son sustancias puras sino una mezcla compleja de compuestos orgánicos volátiles y de carácter aromático que se pueden encontrar en algunas familias de plantas. Generalmente son los que proporcionan el olor característico, y se localizan en diversas partes de la planta como el fruto, la raíz, las flores, las hojas, o la cascara de frutos. Su concentración en la materia prima es muy baja, tanto que a veces resulta imposible su extracción. Normalmente, las plantas más usadas para la obtención de aceites esenciales contienen de media en torno al 0.5-5% en masa de aceite respecto a toda la planta (Casado, 2018).

Estos son líquidos a temperaturas ambiente, aromáticos y generalmente ligeros con densidad inferior a la del agua, aunque existen excepciones. A diferencia de los aceites vegetales son volátiles y su textura no es grasa. Sus puntos de ebullición son altos, por encima del agua. Presentan actividad óptica e índice de refracción alto, propiedades que se utilizan para determinar su pureza, los mismos son insolubles en agua y otros disolventes polares, pero solubles en alcohol y en la mayoría de los disolventes orgánicos como el cloroformo o la acetona (Casado, 2018).

3. Composición

Ahora bien, en cuanto a su composición, los aceites esenciales son mezclas de elevada complejidad constituidas principalmente de terpenos. Los terpenos son un grupo de hidrocarburos inodoros que contribuyen muy poco al aroma y actúan como base diluyente del aceite esencial. Los responsables del aroma suelen ser sustancias que se encuentran en menor proporción que son los compuestos orgánicos con grupos funcionales como cetonas, alcoholes, ésteres, aldehídos, entre otros. A pesar de ser estos los componentes minoritarios, su presencia y combinación en los aceites esenciales es primordial para que estos tengan su aroma característico (Casado, 2018).

4. Agua floral o hidrolato

El agua floral o también llamado hidrolato es el agua residual que se forma por condensación del vapor que ha atravesado la materia vegetal durante el proceso de obtención de un aceite esencial por destilación por arrastre de vapor es un producto acuoso de la destilación. La mayor parte de los componentes de los aceites esenciales son volátiles y relativamente inmiscibles en el agua, característica que permite su separación de la mezcla del destilado. En esta etapa del proceso se obtiene el aceite esencial como producto principal y un hidrolato al que se le considera subproducto. El agua floral, después de la destilación o hidrolato, puede servir para riegos o, a través del sistema de cohobación, puede ser reutilizada en el mismo sistema de destilación. Algunos hidrolatos, como sub-productos de la destilación de aceites, se pueden emplear en baños o jacuzzis, como agua para aromatización y para la limpieza (Antezana Ruiz, 2017).

B. Métodos empleados para la extracción de aceites esenciales

La elección del método depende de la cantidad o características del aceite (volatilidad, punto de ebullición de los componentes, entre otros), como de la planta o la parte de la cual se va a extraer el aceite esencial.

1. Arrastre de vapor

En la destilación por arrastre de vapor de agua se lleva a cabo la vaporización selectiva del componente volátil de una mezcla formada por este y otros “no volátiles”. Lo anterior se logra por medio de la inyección de vapor de agua directamente en el seno de la mezcla denominándose este “vapor de arrastre” la cual no tiene como función “arrastrar” el componente volátil, sino condensarse formando otra fase inmisible que cederá su calor latente la mezcla a destilar para lograr su evaporación. Este caso tendrá la presencia de dos fases inmiscibles a lo largo de la destilación (orgánica y acuosa), por lo tanto, cada líquido se comportará como si el otro no estuviera presente. Es decir, cada una de ellas ejercerá su propia presión de vapor y corresponderá a la del líquido puro a una temperatura de referencia (García Jara, 2017).

En la destilación por arrastre de vapor es posible utilizar un gas inerte para el arrastre. Sin embargo, el empleo de vapores o gases diferentes al agua implica problemas adicionales en la condensación y recuperación del destilado y gas. El comportamiento que tendrá la temperatura a lo largo de la destilación será constante, ya que no existen cambios en la presión de vapor o en la composición de los vapores de la mezcla, es decir, el punto de ebullición permanecerá constante mientras ambos líquidos estén presentes en la fase líquida. En el momento que uno de los líquidos se elimine por la propia ebullición de la mezcla, la temperatura ascenderá bruscamente. La destilación por arrastre de vapor es un método sencillo y de bajo costo, pero su inconveniente es que requiere largos periodos de tiempo y tiene rendimientos bajos en comparación con otros métodos (García Jara, 2017).

2. Destilación con agua

Una de las diferencias más marcadas con la destilación por arrastre de vapor, es que en este método el material botánico está en contacto con agua hirviendo. Un problema frecuente de este tipo de destilación es el olor que transfiere el alambique o destilador, que se da normalmente si el destilador se calienta a fuego directo, este olor no deseado desaparece en el almacenamiento de los aceites esenciales. Existen otro método llamado destilación con agua y arrastre de vapor, el material botánico se encuentra separado del agua hirviendo por una rejilla. Si el destilador se calienta lentamente este método reduce el fenómeno de olor a alambique o al destilador (Vargas Aspíllaga, 2019).

3. Hidrofusión

La hidrofusión es una variación de la destilación por arrastre de vapor normal. En este método, el vapor entra por la parte superior de destilador y la mezcla de agua y aceite esencial

se va condensando a medida que desciende. Este método reduce el tiempo de destilación y es particularmente apropiado para la extracción a partir de semillas. La destilación con agua y arrastre de vapor ofrece muchas ventajas sobre la destilación por arrastre de vapor, pero restringe la posibilidad de tener un vapor de baja presión (Vargas Aspíllaga, 2019).

4. Combinación de destilación y maceración

Este método consiste en colocar la materia prima en contacto con un solvente utilizando agitación para que se logre una mezcla homogénea. Dicho método implica la aplicación de calor y así lograr un menor tiempo de extracción y un mayor rendimiento en el mismo, por ello se utiliza un condensador en la parte superior del matraz, donde se lleva a cabo la extracción, debido a que por el calor aplicado a la mezcla el solvente es volatilizado y tiende a escapar hacia los alrededores, teniendo un condensador se evitan que estos vapores escapen y a su vez las propiedades volátiles del aceite se pierdan. Es en este método se utiliza la agitación, mediante un agitador magnético, para homogeniza la mezcla permitiendo de esta manera que el solvente tenga un mayor alcance y contacto con la materia disminuyendo tiempos de extracción (Medina Recinos, 2022).

5. Extracción con solventes

En una extracción con solventes, el material vegetal es molido o picado y se coloca con agitación en un solvente para lograr la mejor eficiencia en la operación o sobre un lecho de material vegetal se hace circular repetidamente el solvente de extracción. Se realiza frecuentemente a temperatura y presiones moderadas. Los solventes más utilizados son: etanol, metanol, isopropanol, hexano, ciclohexano, tolueno, xileno y acetona (Ortiz, 2021)

6. Extracción mediante solventes volátiles

Mediante el uso de esta metodología la muestra seca y molida es colocada en contacto con solventes como el alcohol o cloroformo, para que estos compuestos puedan solubilizar al aceite esencial, y también puedan extraer sustancias como grasas o ceras, así bien, la sustancia obtenida resulta no ser un aceite puro. Esto es empleado a nivel de laboratorio, debido a que a nivel industrial los costos resultan ser demasiado elevados debido a los solventes y también por su baja efectividad de obtención de sustancias puras (Rodríguez-Álvarez, et al., 2012).

7. Extracción mediante solventes fijos

También llamada “Enflourage” el material vegetal, es puesto en contacto con una grasa. La esencia se solubiliza en la grasa que actúa como vehículo extractor. Se obtiene inicialmente una mezcla de aceite esencial y grasa la cual se separa posteriormente por otros medios fisicoquímicos. En general, se recurre al agregado de alcohol caliente a la mezcla y su posterior enfriamiento para separar la grasa insoluble y el extracto aromático. Esta técnica se emplea para la obtención de esencias florales, pero su bajo rendimiento y la difícil separación del aceite extractor la hacen costosa (Palomarez Ardila, 2015).

8. Hidrodestilación

En una hidrodestilación en la parte inferior del tanque extractor, el cual es normalmente basculante, se coloca agua, luego viene encima una parrilla que soporta el material que va a ser extraído. La salida de vapores, puede ser lateral al tanque o ubicarse en la tapa, pasa a un serpentín o espiral enfriada por agua y posteriormente el vapor condensado y el aceite esencial se recolectan en un separador de fases, el cual debe tener la suficiente altura y diámetro para evitar la pérdida de aceite y además permite la recolección fácil del mismo. Cuando se emplea una hidrodestilación no se requiere de un calderín generador de vapor. Estos sistemas son muy utilizados en el campo, pues, son fáciles de operar y presenta un consumo energético bajo. Los aceites producidos son más coloridos, que los obtenidos por arrastre en vapor y tienden a presentar un cierto olor a quemado los aceites de eucalipto, citronela, y limonaria. Por ende, los aceites siempre van a requerir de una etapa posterior de refinación (Esquivel, 2007).

9. Fluidos supercríticos

La extracción supercrítica es una operación unitaria de transferencia de masa que se efectúa por encima del punto supercrítico del solvente; esta extracción permite controlar y manipular propiedades tales como la difusividad, viscosidad y densidad del fluido mediante pequeños cambios de presión y temperatura, lo que conlleva a una variación en la selectividad y el poder de solvencia de este. La extracción con fluidos supercríticos puede ser realizada en dos modos de operación: mediante una extracción o separación selectivas. En la extracción selectiva envuelve la capacidad de solvatación del fluido utilizado en a la extracción por medio de la manipulación de las condiciones de temperatura y presión y/o modificando la naturaleza química del solvente con la adición de un co-solvente (Esquivel, 2007).

En el segundo método de operación, una separación selectiva se obtiene por medio de despresurización o de un calentamiento o enfriamiento gradual del sustrato, permitiendo con esto un fraccionamiento controlado de los productos a extraer. El proceso de extracción mediante fluidos supercríticos cuenta con cuatro etapas básicas indispensables que son:

- La etapa de presurización: con el fin de alcanzar la presión necesaria del solvente para la extracción que se requiere ya sea por medio de un compresor o de una bomba.
 - Etapa de ajuste de temperatura: remoción o adición de energía térmica ya sea con un intercambiador de calor, baños térmicos o resistencias eléctricas, para llevar el fluido comprimido a la temperatura de extracción.
 - Etapa de extracción: se lleva a cabo en un recipiente extractor a alta presión, el cual contiene la matriz que será procesada. En esta etapa, el fluido entra en contacto con la matriz y arrastra el soluto deseado.
 - Etapa de separación: es en esta donde se separa la sustancia extraída del solvente.
- (Esquivel, 2007).

10. Prensado en frío

El prensado en frío es un método de extracción mecánico que se lleva a cabo a temperaturas bajas, esto con el fin de preservar los ácidos grasos esenciales, vitaminas, antioxidantes, entre otros componentes importantes presentes en el material vegetal. Este procedimiento se lleva a cabo a una temperatura máxima de 45°C con el fin de no dañar la propiedad molecular de los ácidos grasos poliinsaturados, disolución de ceras y otras sustancias, luego se procede a decantar y filtrar el aceite obtenido para almacenar en frascos color ámbar y así evitar la oxidación de estos (Medina Recinos, 2022).

C. Factores que afectan al rendimiento en las extracciones

1. Rendimiento de aceites esenciales

De planta a planta, el rendimiento de un aceite cambia mucho, puede variar desde 0.01% en flores de jazmín y rosa hasta el 4-6% en semillas de cilantro, anís o coriandro. En promedio, las plantas aromáticas herbáceas poseen de 0.5 a 2% del aceite esencial. El rendimiento del aceite es una característica trascendental desde el punto de vista económico y de rentabilidad del proceso de su obtención (Antezana Ruiz, 2017).

Es muy importante establecer correctamente el tiempo de destilación, puesto que de éste dependerá no solamente el rendimiento del aceite, sino su composición, que incide directamente sobre la aceptación y precio del aceite en el mercado. Al inicio de la destilación se extraen compuestos polares, solubles en agua, de bajo peso molecular, pero a medida que avanza el proceso se extraen compuestos menos polares, con mayor peso molecular y menor volatilidad, como, por ejemplo, los sesquiterpenos (Antezana Ruiz, 2017).

Muchos son los factores que inciden sobre la composición y el rendimiento del aceite esencial en la planta. Entre los principales figuran: la localización geo-climática, tipo de suelo, estado de desarrollo de la planta (antes, durante y después de su floración) e inclusive la hora del día cuando se cosecha, entre otros. El rendimiento, se entiende como la cantidad en masa o volumen de aceite esencial (crudo) que es posible extraer de la masa de materia prima vegetal en base seca o húmeda (Antezana Ruiz, 2017).

2. Tipo de materia prima

Los aceites esenciales de las especies tienen variaciones dentro de las mismas familias, dependiendo tanto del origen de la planta, el lugar y la época de producción como la edad y cuidados que esta haya tenido (López De La Cruz, 2015).

3. Tiempo de secado

Del tiempo de secado dependerá el porcentaje de humedad que la planta pueda tener, los sistemas de extracción recurren en algunas ocasiones a la deshidratación de las especies vegetales para obtener un mejor y mayor rendimiento en aceites y esencias. Esto se debe a que, al eliminarse un gran porcentaje del agua, la extracción de los aceites es mucho más

rápida. Así mismo, el tiempo de secado del material influye en la extracción del aceite esencial (López De La Cruz, 2015).

4. Tamaño de partícula

Entre más pequeño sea el tamaño de partícula mejor será la transferencia de calor entre el agua y la especie, en el caso de una extracción por arrastre de vapor, por ejemplo (López De La Cruz, 2015). Es importante recalcar que la resistencia a la difusión entre partículas es menor para un tamaño de partícula más pequeño, esto debido a la trayectoria de difusión más corta, por ello que las partículas muy finas pueden generar sobre presurización en el sistema, por lo que impide el proceso extractivo (Cotera, 2018).

5. Tiempo de extracción

Esto hace referencia a la duración del proceso de extracción, en el cual el aceite contenido en la planta se extrae gradualmente (López De La Cruz, 2015). Determinar el tiempo es fundamental como parámetro de selectividad y de costo del proceso, porque está asociado al periodo de extracción (solubilidad y difusión controlada), que se puede decir también que el tiempo puede estar relacionado con la termo labilidad de los compuestos de interés en términos de periodos de exposición y degradación (Cotera, 2018).

6. Método de extracción

Dependiendo del tipo de método utilizado, ya que con algunos métodos se obtienen mejores resultados, dependiendo de igual manera del tipo de materia prima que se esté utilizando (López De La Cruz, 2015).

7. Presión

La presión influye de manera significativa en la velocidad de extracción, del mismo modo que el tiempo de extracción, se observa que a medida que la presión aumenta más allá de un punto crítico, el rendimiento disminuye ya que aumenta la densidad. Si la densidad es más alta manifiesta un doble efecto, provocando un aumento en el poder de solvatación y existe una disminución en la interacción entre los fluidos y la matriz, de este modo se reduce la porosidad entre las partículas y el transporte de masa a través de la muestra (Cotera, 2018).

8. Temperatura

La temperatura es el parámetro más confuso, ya que existe un efecto de solubilidad competitivo que puede causar el aumento de la presión de vapor y la disminución de la densidad cuando aumenta la temperatura. Así como la densidad de CO₂ a presión constante disminuye cuando aumenta la temperatura y conduce a la reducción de la potencia del disolvente del fluido; al aumentar la temperatura, hay mejoras en la transferencia de masa y en el rendimiento de extracción, debido a que provoca el aumento de la presión de vapor de los compuestos extraíbles (Cotera, 2018).

9. Contenido de humedad

La eliminación del exceso de agua libera los poros de las inter-partículas y, por lo tanto, se incrementa la intensidad del transporte de masa durante la extracción; implícitamente, cuando mayor sea el contenido de humedad, mayor será la probabilidad de formación de una película delgada que se forma entre el matriz simple y la fase fluida supercrítica. Es necesario aclarar que el agua tiene una solubilidad pequeña pero finita en un fluido supercrítico, dando como resultado también que se pueda extraer los componentes objetivo y la separación puede hacerse al final del proceso (Cotera, 2018).

10. Efecto del pretratamiento

El pretratamiento influye en la calidad entre los extractos obtenidos de muestras de diferentes orígenes y también de muestras almacenadas en condiciones secas y congeladas. Es necesario para la recuperación máxima de los productos de alto valor, que los subproductos sean almacenados en estado congelado. También la presencia de agua en el tejido vegetal interfiere con la eficacia de la extracción. Así el efecto del pretratamiento en el triturado dará como resultado un aumento en el componente extraído, por lo tanto, el aplastamiento se podría considerar como un parámetro para incrementar la eficiencia del proceso (Cotera, 2018).

D. Capacidad antioxidante de los aceites esenciales

La capacidad antioxidante que tiene una matriz biológica está representada por el contenido de metabolitos secundarios. Es una práctica común en el estudio de compuestos naturales para identificar a los antioxidantes como molecular capaces de reaccionar con los radicales o provistas de poder reductor para contrarrestar el estrés oxidativo causado por los radicales. Este enfoque es atestiguado por la química en varias pruebas desarrolladas para analizar la actividad antioxidante de extractos naturales o fitoquímicos aislados, que se basan en la reacción del antioxidante potencial con algún radical persistente coloreado (por ejemplo, algunas especies oxidantes no radicales como los iones de Fe^{3+} (Boom, 2018).

Este enfoque por definición no es del todo correcto. Por definición, los antioxidantes son compuestos capaces de retardar o retrasar la oxidación de un material oxidable, incluso cuando se usan en una cantidad muy moderada ($< 1\%$, comúnmente 1 a 1000mg/L) en comparación con la cantidad de material que tienen que proteger. Centrándonos en procesos de relevancia en los sistemas biológicos o en la ciencia de los alimentos, los materiales a proteger suelen ser lípidos, proteínas, carbohidratos y en menor medida, otras moléculas orgánicas que componen los tejidos animales o vegetales. Su oxidación ocurre por una reacción en cadena de radicales mediada por radicales peroxilo que es paralela a la autooxidación de los hidrocarburos (Boom, 2018).

La capacidad antioxidante de los aceites esenciales se atribuye principalmente a los compuestos activos presentes como los terpenos, fenoles, ácidos grasos y flavonoides presentes en los mismos. Esto puede deberse al alto porcentaje de constituyentes principales,

pero también a la presencia de otros constituyentes en pequeñas cantidades o a la sinergia entre ellos (Boom, 2018).

1. Antioxidantes

Los antioxidantes son compuestos que inhiben la oxidación. Esta es una reacción química que puede producir radicales libres, lo que lleva a reacciones en cadena que pueden dañar las células de los organismos. Para equilibrar el estado oxidativo, las plantas y los animales mantienen sistemas complejos de antioxidantes superpuestos, como el glutatión y las enzimas (como la catalasa y superóxido dismutasa), producidos internamente, o se pueden usar antioxidantes dietéticos como la vitamina C y vitamina E; que en este caso son llamados dietéticos porque los seres humanos no la logran producir y requieren adquirirlos mediante alimentación (Boom, 2018).

2. Métodos analíticos para la cuantificación de la capacidad antioxidante

Si bien desde hace más de 10 años existen métodos para determinar la capacidad antioxidante de una sustancia y con el correr de los años salen nuevos métodos, es cierto indicar que aún existe la urgencia de crear métodos unificados para medir la capacidad antioxidante.

Se busca entre otras cosas que dicho método ha de ser algo unificado para comprobar la capacidad antioxidante, el cual debería estar normalizado y debe cumplir con los siguientes requerimientos:

- Usar un radical biológicamente importante.
- Ser una técnica simple.
- Usar un punto final determinado y un mecanismo acreditado.
- Manejar instrumentación fácilmente disponible.
- Ser reproducible.
- Ser parametrizable.
- Ser configurable a formatos de tamizaje de alta capacidad para control de calidad de rutina en gran cantidad de muestras.

(Boom, 2018).

3. DPPH

El DPPH es la abreviatura común para el compuesto químico orgánico 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl, polvo cristalino de color oscuro compuesto de moléculas estables de radicales libres. El DPPH tiene dos aplicaciones principales, ambas en investigación de laboratorio: una y más importante aplicación es ser un monitor de reacciones químicas que involucran radicales, más notablemente es un ensayo antioxidante común, en donde ofrece el primer enfoque para evaluar el potencial antioxidante de un compuesto, un extracto u otras fuentes biológicas. Este es el método más simple, en el que el compuesto o extracto prospectivo se mezcla con la solución DPPH y se registra la absorbancia después de un período de tiempo definido (Boom, 2018).

El DPPH se describe como un radical libre invariable en virtud de la deslocalización del electrón de reserva sobre la molécula en su grupo, de modo que las moléculas no se dimerizan, como casi todos los radicales libres. La deslocalización también da lugar al color violeta vivo, con una absorción en solución de etanol en torno a 520 nm. Al mezclar la solución de DPPH con una sustancia que puede conceder un átomo de hidrógeno, da lugar a la forma reducida con pérdida de color violeta. Representando al radical DPPH por Z* y la molécula donante por AH (Boom, 2018).

La determinación de la actividad antioxidante de varios tipos de alimentos utilizando DPPH es comparable a otros métodos. El análisis de antioxidantes por otros métodos puede limitarse a aquellos compuestos solubles en los disolventes seleccionados. La ventaja de este método es que permiten que el DPPH reaccione con toda la muestra y el tiempo suficiente en el método permite que el DPPH reaccione lentamente incluso con antioxidantes débiles (Boom, 2018).

E. Capacidad de inhibición antibacteriana de los aceites esenciales

La composición química de los aceites esenciales extraídos de varias plantas juega un papel fundamental en su capacidad antimicrobiana. De manera general, los grupos fenólicos contenidos en ellos son altamente efectivos. Entre estos los aceites de clavo de olor, orégano, romero, tomillo, salvia y vainilla fueron más efectivos contra los microorganismos, inhibiendo principalmente las bacterias gram-positivas en comparación con las gram-negativas. Existen también, algunos compuestos que no son fenólicos efectivos contra bacterias gram-negativas y contra hongos gram-positivos. Los aceites con altos niveles de eugneol, aldehído y cítricos son por lo general fuertes antimicrobianos. Los terpenos volátiles carvacol, p-cimeno y timol son probablemente los responsables por la actividad antimicrobiana de algunos aceites esenciales (Chamorro, 2010).

El aceite esencial puede presentar algunas dificultades en su aplicación como conservantes en las cuales se pueden observar: la impregnación en el producto alimenticio, volatilización rápida del aceite, estas dificultades podrían solucionarse a través de un soporte que contenga en su interior el aceite esencial y que permita su liberación paulatinamente (Chamorro, 2010).

1. *E. Coli* en alimentos

Gran cantidad de bacterias patógenas se encuentran distribuidas de gran manera en la naturaleza, en reservorios acuático y animales, los cuales son una fuente importante de los mismos. Entre otros la *Escherichia coli* ha sido identificado como principal agente etiológico responsable de los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos; esta bacteria está asociada a enfermedades gastrointestinales producto del consumo de alimentos contaminados tanto de origen como en proceso por falta de higiene e inadecuadas prácticas de procesamiento y conservación (Argote-Vega, 2017).

2. *Salmonella* en alimentos

Las bacterias pertenecientes al género *Salmonella*, se caracterizan por ser bacilos gran negativos, anaerobios facultativos, que utilizan citrato como única fuente de carbono y poseen metabolismo de tipo oxidativo y fermentativo. La salmonelosis se presenta en términos generales dentro de dos espectros clínicos: el primero dando fiebre entérica más conocida como fiebre tifoidea, caracterizada por ser un cuadro febril sistémico, y el segundo, la gastroenteritis, caracterizada por dar síntomas como el dolor abdominal, malestar general, vómito, diarrea y en algunos casos fiebre (Méndez, 2011).

F. Métodos para la mejora en la extracción de aceites esenciales

1. Métodos enzimáticos

Otro método alternativo de gran uso son las enzimas para degradar tejidos vegetales, las enzimas son proteínas ideales para asistir en la extracción, modificación o síntesis de compuestos de origen natural (Puri, et al., 2012). La extracción enzimática se basa en la habilidad de las enzimas de catalizar reacciones muy específicas y selectivas. Así como en la habilidad de funcionar en soluciones acuosas a pH y temperatura específicas. Las enzimas tienen la capacidad de degradar o desestabilizar las paredes celulares o membranas del tejido vegetal, favoreciendo y mejorando la extracción de compuestos, estudios recientes sobre la extracción asistida por métodos enzimáticos han demostrado una rápida extracción, alta recuperación y reducción de solvente, así como una disminución en la energía del proceso con respecto a los métodos sin asistencia enzimática (Sánchez, 2019).

Extracción enzimática-prensada

Actualmente se están desarrollando métodos de extracción asistida por enzimas debido a la necesidad de tecnologías de extracción que sean amigables con el medio ambiente. Una aplicación particularmente útil de las enzimas es el aumento del rendimiento y/o reducción del uso de solventes necesarios para la extracción (Ortega Romero, 2015).

La extracción acuosa enzimática es una tecnología emergente en la industria de grasas y aceites ya que ofrece ventajas en comparación con la extracción convencional. Se elimina el consumo de solventes reduciendo los costos de inversión y los requisitos de energía. Posibilita la recuperación de aceite y de proteína de manera simultánea, además la calidad de los aceites obtenidos con tratamiento enzimático es relativamente buena en comparación con extraídos con solventes (Ortega Romero, 2015).

La hidrólisis enzimática de la pared celular es una opción para el tratamiento previo de las muestras oleaginosas en moléculas, ya que hidroliza los complejos de lipoproteínas y lipo-polisacáridos en moléculas más simples, liberando de esta manera aceite extra para la extracción. Por ello, el prensado en frío asistido por enzima es una alternativa ideal para la extracción de muestras oleaginosas, donde el conocimiento previo de la composición de la pared celular de la muestra es útil para la selección de las enzimas (Ortega Romero, 2015).

Enzimas

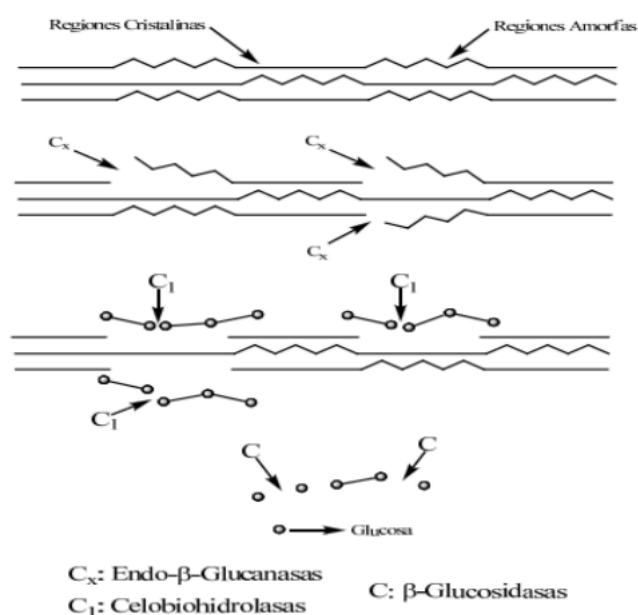
Las enzimas son proteínas que catalizan todas las reacciones bioquímicas. Además de su importancia como catalizadores biológicos, tienen muchos usos médicos y comerciales. Un catalizador es una sustancia que disminuye la energía de activación de una reacción química. Al disminuir la energía de activación, se incrementa la velocidad de la reacción. La mayoría de las reacciones de los sistemas vivos son reversibles, es decir que en ellas se establece el equilibrio químico. Por lo tanto, las enzimas aceleran la formación de equilibrio químico, pero no afectan las concentraciones finales del equilibrio. Así mismo, las enzimas son de interés práctico. El comercio de las enzimas para uso industrial y doméstico asciende a centenares de millones de dólares anualmente en todo el mundo. Las enzimas industriales se utilizan en la producción de productos químicos y farmacéuticos cuyo costo es de miles de millones de dólares (Zenteno, 2013).

Reacciones de hidrólisis enzimática en las células oleaginosas

Las celulasas son proteínas obtenidas de procesos naturales de fermentación capaces de degradar la celulosa. Se encuentran formado un complejo enzimático que actúa de forma sinérgica en la degradación de la celulosa y que está conformado por tres tipos de enzimas: endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa. El mecanismo de hidrólisis catalítica mediante el cual ocurre la reacción de degradación de la celulosa a glucosa por parte de componentes de las celulasas que producen la ruptura del enlace β -1,4-glicosídico del polímero celulósico se muestra en la figura 1 (Zenteno, 2013).

Durante la primera etapa de la reacción, las endoglucanasas hidrolizan los enlaces internos del polímero de la celulosa específicamente en las regiones amorfas o en la superficie de las microfibras, produciendo oligosacáridos de menor peso molecular, celodextrinas y celobiosa. Posteriormente las exoglucanasas inician la hidrólisis en los extremos no reductores de la cadena, presentando una alta actividad por la celulosa amorfa para producir celobiosa y finalmente las β -glucosidasas completa la degradación de la celulosa catalizando la hidrólisis de celobiosa a glucosas (Zenteno, 2013).

Figura 1. Mecanismos de hidrólisis catalítica.



(Zenteno, 2013).

En cuanto a las reacciones de hidrólisis llevadas a cabo por las enzimas proteolíticas en las células de semillas oleaginosas están relacionadas con la hidrólisis de la membrana de los cuerpos lipídicos, los cuales están conformados por un tipo de proteína de bajo peso molecular llamadas oleosinas que son las principales responsables de mantener la integridad de los cuerpos lipídicos durante el proceso de maduración de las semillas oleaginosas (Zenteno, 2013).

Estudios sobre la extracción de aceite vegetal con enzimas

En los últimos años el uso de enzimas de tipo celulíticas y proteolíticas para mejorar la extractabilidad del aceite en diferentes semillas ha incrementado notoriamente, aplicándose este tipo de tecnología a la extracción de aceite en varias semillas y frutos oleaginosos como se menciona en los siguientes trabajos.

1. Rosenthal y col. (2001) implementaron la extracción acuosa enzimática de aceite y proteína de soya, para este fin, evaluaron diferentes celulasas y proteasas comerciales, encontrando que las proteasas son las únicas que muestran un incremento significativo en la eficiencia de extracción del aceite de 48.5 a 58.7%, las condiciones fueron las siguientes: la concentración de enzima: 0.1, 0.45, 2 w/w %. El tamaño medio de partícula: 212.5, 449.5, 855 m; el tiempo de hidrólisis: 30; 60; 120 min.
2. Sharma, (2002) utilizó la extracción acuosa asistida por la enzima. Esta consistía en extraer el aceite de cacahuete bajo condiciones óptimas utilizando la enzima Protozyme. Las condiciones óptimas fueron: concentración de la enzima de 2.5% (w/w) en 10 g de semillas de maní, de pH 4.0 a 40 °C y 18 h de incubación con

agitación constante a 80 rpm. Para la separación se utilizó centrifugación en la que se recuperó de 86-92%.

3. Xie y col., (2011) señalan que la extracción de aceite de germen de trigo se evaluó con las siguientes enzimas Viscoenzyme L, Multifect CX 13L, Multifect CX GC y Alcalaa 2.4L FG. Basándose en los resultados experimentales, el más alto rendimiento de aceite siendo de 66.5% (w/w) utilizando la enzima Alcalasa 2.4L, bajo las siguientes condiciones; líquido relación sólida / 16.5, concentración de enzima 1.1% y el tiempo de extracción de 19.25h.

(Zenteno, 2013).

2. Métodos mediante el uso de ultrasonidos

Ultrasonido:

El ultrasonido se puede definir básicamente como la energía generada por ondas sonoras de 20,000 o más vibraciones por segundo, por encima del espectro audible. El modo de acción del ultrasonido es atribuido a un fenómeno llamado cavitación. Este se lleva a cabo cuando dentro del líquido las ondas sonoras que se propagan en él crean ciclos alternados, de baja presión (rarefacción) a alta presión (compresión). Estos ciclos continuos de alta-baja presión crean pequeñas burbujas o huecos en el líquido que colapsan violentamente cuando ya no pueden absorber energía (fenómeno llamado “cavitación”), produciendo un intenso calentamiento local, altas presiones, corrientes en chorro de líquido y dramáticas velocidades de calentamiento y enfriamiento (Sánchez Madrigal, 2019).

La cavitación produce fuerzas de cizallamiento intensas y cambios en las propiedades físicas que permiten que el solvente penetre más profundo en el sólido, aumentando la velocidad de difusión de la molécula deseada del solvente. Dicho colapso de las burbujas de cavitación es conocido como implosión que llega a dañar a las superficies sólidas que se encuentran cercanas a su punto de colapso. En sistemas acuosos a una frecuencia ultrasónica de 20kHz, el colapso de cada burbuja de cavitación genera temperaturas de alrededor de 5000 °C y presiones de alrededor de 2000atm (Sánchez Madrigal, 2019).

La energía liberada por la cavitación de una burbuja es extremadamente pequeña, pero en este proceso millones de burbujas colapsan cada segundo. El efecto producido es muy intenso y ha sido utilizado para limpieza y desinfección de equipos y más recientemente para favorecer la difusión en procesos de algunas áreas de la industria, por ejemplo, en la industria de alimentos se utiliza como sistema de mezclado y emulsificación, impregnación y extracción, en congelación y en la eliminación de espuma en bebidas, entre otros. Por todo lo anterior a la sonicación se le atribuyen ventajas en los procesos de extracción relacionadas con la mejora de transferencia de masa y ruptura celular (Sánchez Madrigal, 2019).

Efectos del ultrasonido:

El ultrasonido produce daños físicos y químicos. Al final de la cavitación, la burbuja implota, incrementando de sobremanera la presión y la temperatura en el punto de colapso,

lo que genera una “proyección de jet” que se focaliza sobre un punto dado del sólido adyacente, generando entonces daño físico (Sánchez Madrigal, 2019).

El daño físico ocasionado por efectos del ultrasonido sobre la pared celular de plantas ha sido reportado y comprobado por diversos autores mediante análisis químicos, cuantificando compuestos derivados de la pared celular y mediante la microscopia, revelando orificios ocasionado por la implosión de burbujas sobre la pared celular. Otro efecto de las altas temperaturas y presiones del colapso, pueden conducir a la disociación del agua en radicales hidróxilos (OH^-) y átomos de hidrógeno (H^+). Siendo radicales extremadamente reactivos y responsables de daños oxidativos a compuestos orgánicos. Se ha reportado que el ultrasonido puede despolimerizar los carbohidratos presentes, tanto de los polímeros componentes de la pared celular de plantas como de los mismos azúcares que se encuentran dentro. Sin embargo, también reportan que es necesaria más evidencia ara evaluar el efecto del ultrasonido sobre la extracción de compuestos como la inulina, encontrando los factores adecuados como el tiempo, frecuencia e intensidad adecuada para lograr una mayor extracción sin dañar las moléculas (Sánchez Madrigal, 2019).

Factores que afectan el ultrasonido:

El efecto del ultrasonido durante la extracción de compuestos vegetales depende de la combinación de diferentes factores directamente relacionados con la aplicación del ultrasónico como: frecuencia, intensidad, y tiempo de exposición; así como los factores directamente relacionados con el efecto de lixiviación, como: solvente, relación sólido-líquido y temperatura. Los factores antes mencionados deben ser elegidos adecuadamente de acuerdo con la matriz vegetal de donde se pretende extraer el compuesto, ya que la cavitación ultrasónica es un fenómeno físico cuyo rendimiento depende de dichos factores (Sánchez Madrigal, 2019).

Eficiencia de la extracción asistida por ultrasonido con respecto a métodos tradicionales.

En 2005, Gao demostró que la extracción asistida por ultrasonido de flavonoides en *Saussurea medusa* Maxin (una valiosa y tradicional hierba china) tiene ventajas de eficiencia y simplicidad sobre métodos tradicionales como extracción por solventes a temperatura ambiente, reflujo térmico y Soxhlet (Véase Tabla 1) (Azuola, 2007).

Tabla 1. Extracción de flavonoides en *Saussurea medusa* Maxim, utilizado distintos métodos tradicionales y no tradicionales

Técnica	Flavonoides (% m/m)	Tiempo	Eficiencia (mg/h)
Solvente a temperatura ambiente	3.0%	24 h	0.02
Reflujo térmico	3.9%	6 h	0.13
Soxhlet	4.1%	20 h	0.04
Ultrasonido	3.5%	30 min	1.4
Microondas	4.1%	6 min	8.2

(Azuola, 2007).

Según este estudio, el ultrasonido tiene una eficiencia 70 veces mayor que la extracción por solventes, 11 veces mayor que la extracción por destilación y 35 veces mayor que la extracción por Soxhlet. Estudios realizados para extracción de alcaloides, los cuales están dentro de los grupos más importantes de metabolitos secundarios, muestran que la filtración de una solución *zonificada* en presencia de surfactantes (sustancias que influyen por medio de la tensión superficial en la superficie de contacto entre dos fases), aumenta la eficiencia y disminuye el consumo por solvente en comparación con una extracción por solvente (etil acetato) y Soxhlet (véase Tabla 2). Se obtuvieron alcaloides con una eficiencia mayor a 8.14 y 46.85 veces mayor por utilización del ultrasonido que por el uso de la extracción Soxhlet y solventes respectivamente (Azuola, 2007).

Tabla 2. Extracción de alcaloides por distintos métodos a partir de *H. muticus*.

Método de extracción	Tiempo (h)	Total, obtenido (mg)	Eficiencia (mg/h)
Solventes	72	0.8	11.1
Soxhlet	18	1.15	63.9
Ultrasonido-filtración	2.5	1.3	520

(Azuola, 2007).

Optimización del método por ultrasonidos

Según Palma y Barroso, las variables que se deben analizar para optimizar la técnica de extracción asistida por ultrasonido son temperatura, solvente, volumen del solvente, tiempo de extracción, tamaño de la punta de prueba, poder del ultrasonido y duración del ciclo aplicado. Analizar estas variables para la extracción de ácido málico y tartárico a partir de uvas y semillas de uva, se determinó que, a mayor temperatura, mayor extracción de estos compuestos se obtiene (Palma & Barroso, 2001).

Fundamentos del ultrasonido:

El ultrasonido, es una técnica cuyo objetivo es conseguir un efecto significativo en diferentes procesos químicos. El uso de dicha técnica permite realizar procesos de larga duración, en minutos. A su vez, permite reducir el consumo de disolvente, reducción del consumo energético y de la manipulación y trabajo, todo esto frente a procesos convencionales como lo son la maceración, arrastre de vapor o hidrodestilación (Soler-Gallardo, 2021).

La sonda de ultrasonido genera ondas mecánicas con una frecuencia superior a 20 KHz, superando el umbral correspondiente al oído humano. A la hora de desarrollar este trabajo, se han empleado tanto un baño como una sonda de ultrasonidos. Ambos trabajan basándose en el fenómeno de cavitación, el cual consiste en procesos de expansión y colapso en la muestra, provocando por las ondas del ultrasonido (Soler-Gallardo, 2021).

Algunas de las múltiples aplicaciones que se presentan en la sonicación:

- Proporcionar la energía necesaria para que tengan lugar ciertas reacciones químicas
- Aplicaciones biológicas, como, por ejemplo, romper membranas celulares y así provocar la liberación del contenido celular situado en su interior.
- Aplicaciones médicas.
- Disolución de sólidos y eliminación de gases disueltos en líquidos.
- Otras aplicaciones como: nanotecnología, proceso de cristalización, paleontología.

(Soler-Gallardo, 2021).

Efectos físicos del ultrasonido:

Fragmentación:

Se produce principalmente por las colisiones entre las partículas de materia y las ondas de choque producidas por el colapso de burbujas de cavitación en el líquido. Cuando el ultrasonido se aplica en un medio líquido con la materia prima, se puede observar que se produce una fragmentación de dicha materia, que, comparando con otros métodos convencionales como la maceración, no aparece (Soler-Gallardo, 2021).

Erosión:

El uso del ultrasonido provoca una erosión en la materia permitiendo un mejor acceso del agua (disolvente) en ella y mejorando así los rendimientos de extracción y solubilización (Soler-Gallardo, 2021).

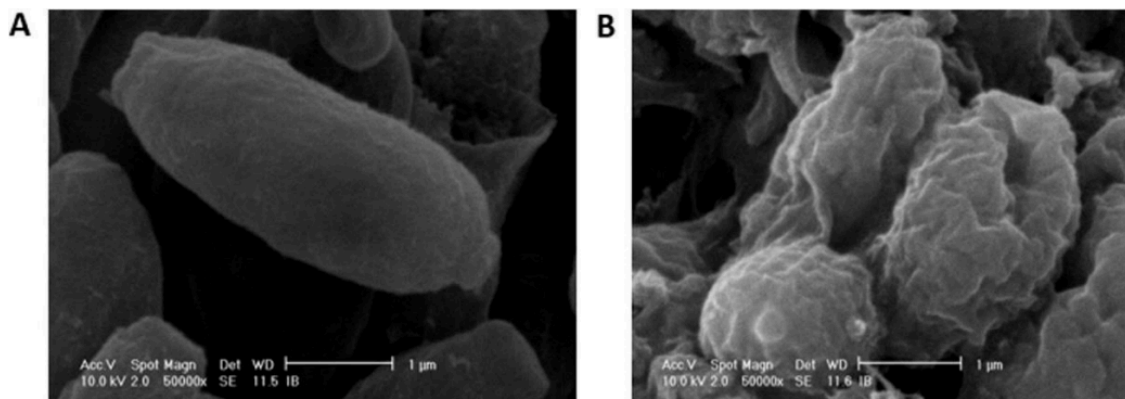
Efecto sonocapilar:

Se define por efecto sonocapilar, al aumento de la profundidad y la velocidad de penetración del líquido en la materia cuando ésta es sonicada (Soler-Gallardo, 2021).

Sonoporación:

Mayormente se aplica en el ámbito de la biología y se emplea para la absorción celular en moléculas o para la destrucción celular. Principalmente, la sonoporación ayudaría a liberar el contenido celular (Soler-Gallardo, 2021).

Figura 2. Comparativa de molecular sin trata(A) y tratada (B) con ultrasonido.



(Soler-Gallardo, 2021).

Destexturación:

Al aplicar el ultrasonido, se observa una destrucción en la estructura de la materia. Esto no afecta prácticamente a los rendimientos de extracción, pero sí se ve que afecta una mayor selectividad de terpeno y modificaciones físicas en las semillas tratadas (Soler-Gallardo, 2021).

Extracción de aceite esencial asistida por ultrasonidos

El empleo de ultrasonido afecta principalmente a la cavitación acústica, que consiste en la formación y crecimiento de burbujas hasta la implosión ocurrida durante la propagación de una onda de ultrasonido en medio líquido. Cuando se trabaja a altas intensidades, se generan las burbujas de cavitación al superar las fuerzas de atracción entre moléculas. De igual manera, cuando dichas burbujas alcanzan un tamaño crítico, colapsan dando lugar un punto caliente transitorio y a su vez, generando chorros de alta velocidad de líquidos que producen daños en la superficie material (Soler-Gallardo, 2021).

G. Aceite esencial de tomillo

1. Tomillo

El uso del tomillo data de tiempos muy antiguos, los egipcios lo utilizaban con una sustancia aplicada en el proceso de momificación. El nombre *Thymus* proviene del griego thymus que significa fuerza o coraje, ya que se empleaba principalmente como infusión energizante y como antiséptico de herida en guerreros. Este, crece espontáneamente por todo el sur de Europa, ya sea por semillas o más frecuentemente por división de las matas en primavera. Prefiere los terrenos ligeros y pedregosos y cuando es cultivado, requiere riegos repetidos durante los calores excesivos (Viadurre, 2016).

Descripción botánica.

El tomillo pertenece a la familia de las labiadas, alcanza de 15 a 30 cm de altura, muestra hojas opuestas, lanceoladas, con bordes enrollados y densamente pilosas. Las flores del tomillo son diminutas, agrupadas en racimos terminales muy densas, rosadas o blanquecinas. El labio superior muestra tres dientes cortos y el inferior dos largas y estrechas lacinias. La corona mide entre 7 y 8 mm y aparece dividida en dos labios, el superior y el inferior. Toda la planta desprende un fuerte aroma al estar provista de glándulas esenciales (Viadurre, 2016).

Composición química del tomillo.

Este posee aceite esencial en una concentración de 0.8-2.5% que está constituido principalmente por timol (40%), p-cimeno (15-50%), alcanfor (11-16%), carvacol (2.5-14.6%), linalol (4%), 1,8-cineol (3%), γ -terpineno (1-5%) borneol, acetato de bornilo, acetato de linalino, geraniol, α y β -pineno, limoneno (Viadurre, 2016).

También, en concentración de flavonoides posee heterósidos del luteol y apigenol, y en menor medida flavonas metoxiladas: cosmosiina, timonina, isotiminina, timusina, naringenina. También se ha señalado la presencia de flavanonas, flavonoles y heterósidos de luteolina. El rendimiento porcentual del aceite esencial del tomillo varía según el método utilizado para su extracción ya sea por destilación con agua, destilación con vapor de agua o la combinación de ambos (Viadurre, 2016).

Cosecha y postcosecha del cultivo:

Aunque se pueden iniciar los cortes de material vegetal vegetativo a los 60 días, práctica que promueve el desarrollo vegetativo, algunos productores de tomillo no cosechan durante el primer año de cultivo de la planta y pueden lograr buenos rendimientos desde el segundo hasta el sexto año. Después de seis años, los cultivadores comerciales de tomillo aran, para luego establecer nuevas plantas (AGEXPORT, S.f.).

Como sucede con la gran mayoría de plantas, el tiempo de cosecha difiere en gran medida si se cultiva tomillo para aceite esencial o para material vegetal. Ya que, si se desea maximizar el rendimiento del aceite esencial, se debe realizar las sesiones de cosecha, cuando el 50% de las flores han florecido (AGEXPORT, S.f.).

2. Aceite esencial de tomillo.

Descripción:

El aceite esencial de tomillo se extrae mediante un proceso de destilación de las partes aéreas de la planta. El componente principal del aceite esencial de tomillo es el timol, que contiene propiedades medicinales sobresalientes. El timol es una sustancia muy potente que puede llegar a ser peligroso para la salud si no se usa de manera correcta (Viadurre, 2016).

Propiedades:

Entre las propiedades del aceite esencial de tomillo se pueden encontrar las siguientes:

- Antimicrobiano
- Antioxidante
- Antirreumático
- Antiséptico
- Astringente
- Diurético
- Bactericida
- Tónico nervioso
- Balsámico
- Cicatrizante
- Estimulante del sistema inmunitario y de la circulación (Viadurre, 2016).

Actividad antimicrobiana:

Actualmente está comprobado que los componentes fenólicos del tomillo como el timol y carvacrol tienen actividad antibacteriana frente a gérmenes gram positivos y gram negativos. Esta actividad se debe a su acción sobre la membrana bacteriana, además de poseer acción antifúngica y antivírica. El timol es un producto extraído por la industria farmacéutica y ha sido extensamente documentado por su acción antibacteriana, antiviral y fungicida sobre diferentes tipos de microorganismos aún aquellos que ya son resistentes a la medicina natural (Viadurre, 2016).

El agente activo del tomillo (*Thymus vulgaris*) es el timol que se caracteriza por su poder desinfectante y fungicida. Por su sabor agradable está presente en la formulación de diversos enjuagues bucales, pastas de dientes y entre otros productos. El timol y el carvacrol que son componentes del aceite esencial presente en el tomillo, se emplean en la industria alimenticia como antibacterianos; estos aceites han mostrado un efecto frente a bacterias gram negativas y gram positivas, con resultados similares a los obtenidos por antibióticos y al compararlos con el efecto del ácido láctico sobre distintos patógenos, se ha encontrado una inhibición superior al 50% por parte de los aceites (Viadurre, 2016).

El aceite esencial de tomillo actúa como un tónico nervioso, y en forma similar al romero estimula el cerebro y la memoria por lo que resulta útil en casos de fatiga o debilidad. La acción primaria del aceite esencial de tomillo es sobre el tracto genito-urinario y sobre las vías respiratorias compartiendo incluso propiedades asépticas con las del eucalipto. Dicho aceite posee timol, carvacrol, γ -terpineno y ρ -cimeno (Viadurre, 2016).

3. Caracterización del aceite esencial de tomillo.

Tabla 3. Principales componentes del aceite esencial de tomillo.

Componente	Contenido en aceite
Timol	20-60%
Carvacrol	3-15%
p-cimeno	10-20%
Linalol	1-5%
Borneol	1-5%
Terpineno	5-15%
Myrceno	1-5%
Cineol (Eucaliptol)	20-40%
Ácido rosmarínico	< 1%

(Viadurre, 2016).

Tabla 4. Evaluación sensorial del aceite de tomillo.

Atributo	Descripción
Aroma	Contiene un aroma herbáceo con notas especiadas.
Sabor	Posee un sabor fuerte de carácter herbáceo con toques amargos y notas amaderadas debidos al timol y carvacrol

(Cáceres, 2021).

Tabla 5. Características fisicoquímicas del aceite esencial de tomillo.

Parámetro	Rango
Densidad (20 °C)	0.850-0.950 g/mL
Índice de refracción (20 °C)	1.490-1.515

(Cáceres, 2021).

4. Aplicaciones del aceite esencial de tomillo.

El aceite esencial de tomillo está compuesto principalmente por mono terpenos oxigenados como lo son el timol, carvacrol y linalol, pero también posee mono terpenos hidrocarbonados como él γ -terpineno, p-cimeno, α -pineno y α -tujueno además de contener ésteres acéticos, cetonas y aldehídos. Las cualidades del aceite esencial de tomillo de deben principalmente a sus componentes: timol y carvacol. El timol conforma un 50% del aceite esencial y ha sido reportado por varios autores como un potente agente antimicrobiano; ya que este compuesto es capaz de desintegrar la membrana externa de las bacterias, debido a que se une a las membranas bacterianas de manera hidrofóbica y por puentes de hidrogeno, causa perturbaciones en la membrana incrementando la permeabilidad, que conducen a la pérdida de iones de potasio y ATP intracelular y finalmente muerte celular. Algunos trabajos mencionan que la fuerte acción antimicrobiana del timol y carvacrol se atribuye a la presencia

del radical de hidroxilo, debido a que el p-cimeno, es un precursor biológico de estos componentes (López Ambrocio, 2015).

Industria farmacéutica:

El aceite esencial de tomillo comprende una gran gama de aplicaciones, la industria farmacéutica lo utiliza para la elaboración de medicamentos por sus propiedades funcionales. En la perfumería se emplea para comunicar a los perfumes un aroma intenso, parecido al campo o similares a cuero; en la industria cosmética es utilizado para elaborar repelentes y para perfumar jabones por su aroma resistente (López Ambrocio, 2015).

Industria alimentaria:

En la industria avícola, el aceite esencial de tomillo se emplea como un aditivo en la comida de pollos de engorde, debido a que los animales que se les suministra presentan un aumento de peso sin que la calidad de la carne se vea afectada; en la ganadería es utilizado como un aditivo antiséptico natural. También, en la industria agroalimentaria el aceite de tomillo es utilizado como conservador de carnes; y sus componentes como el cinamaldehído se añade a chicles y helados, el carvacrol se utiliza en bebidas no alcohólica. Es importante mencionar que las hojas secas de tomillo, su aceite esencial y el timol están catalogadas por la FDA (Food and Drug Administration, EE.UU.) como alimentos aptos para el consumo humano y también como aditivos alimentarios; así mismo el timol esta evaluado entre las sustancias cuyo uso como condimento está permitido, siendo la cantidad máxima permitida en alimentos de 50mg/kg y en bebidas de 10mg/kg (López Ambrocio, 2015).

5. Producción de aceite esencial

El rendimiento promedio de aceite esencial se encuentra de un 1 y un 3% de rendimiento seco. Por lo que se puede esperar de 44 a 132 libras de aceite esencial por hectárea. Para producir un kilo de aceite con un rendimiento medio del 2% se necesitan alrededor de 50 kilos de materia seca y se estima un costo de Q 947.00 por kilogramo de aceite. En promedio se estima una producción por hectárea de 40 kilos de aceite en cada cosecha, pudiendo llegar a obtener cuatro cosechas por año (AGEXPORT, S.f.).

Los costos de producción varían dependiendo de la zona de producción, el sistema de siembra y del manejo tecnológico del cultivo incluyendo el manejo postcosecha y la técnica de destilación empleada. Estas dos últimas actividades, constituyen la parte más importante para obtener un aceite esencial de buena calidad que sea aceptado en el mercado (AGEXPORT, S.f.).

III. Justificación

Un aceite esencial es un producto volátil obtenido a partir de materia prima vegetal (semillas, corteza, tallos, raíces, flores y otras partes de las plantas) mediante una destilación, ya sea hidrodestilación, arrastre de vapor, enfleurage, extracción por microondas, entre otros. Los aceites esenciales presentan una amplia comercialización en el mercado mundial de la medicina, alimentos, fragancias, entre otros. Los aceites esenciales, al ser sustancias líquidas volátiles, se pueden extraer por diversos métodos, entre los más usados se encuentra el método por arrastre de vapor de agua. La importancia en la extracción de los aceites esenciales recae en que estos están destinados para diversos usos en la industria, desde el uso en la industria alimentaria, hasta el uso de estos en la industria farmacéutica por las propiedades de cada aceite. Los aceites esenciales contienen sustancias responsables del aroma de las plantas, consideradas como mezclas de hasta 100 componentes. Están formados por mezclas de productos químicos, en su mayoría por terpenos, que son hidrocarburos, los terpenos mayormente comunes el limoneno y el pineno (Hidalgo, 2017).

Los aceites esenciales son volátiles y son líquidos a temperatura ambiente, por ello se les denomina aceites volátiles, aceites etéreos o esencias. Por otro lado, poseen un índice de refracción elevado. Cada aceite esencial tiene un índice propio y cambia si este se diluye o mezcla con otras sustancias. Los aceites esenciales no son tóxicos, sin embargo, es importante controlar la dosis de suministro. También, se degradan químicamente frente a la luz solar, aire, calor, ácidos y álcalis fuertes generando oligómeros de naturaleza indeterminada; presentan propiedades solventes para los polímeros con anillos aromáticos presentes en su cadena. En la industria alimentaria son utilizados como condimentos para poder asegurar el mantenimiento de las carnes y comidas preparadas, embutidos, helados y demás. Ahora bien, en la industria de bebidas, los aceites esenciales son utilizados como saborizantes, sean en bebidas carbonatadas o en licores (Hidalgo, 2017).

Para Guatemala los aceites esenciales son de gran importancia ya que, tanto en términos económicos como culturales, en la industria tienen bastantes usos y aplicaciones como en la industria de perfumería en donde Guatemala es conocida por la producción de aceites esenciales de alta calidad de cardamomo, ylang-ylang y la rosa ya que estos mismos aceites son utilizados para la industria de perfumes y cosméticos lo que contribuye significativamente al país. De igual manera, en la agricultura ya que la producción de plantas que son fuentes de aceites esenciales, como la menta y la citronela, son parte importante de la agricultura guatemalteca. Igualmente, en la industria de alimentos y bebidas son utilizados como saborizantes y preservantes debido a las características microbiológicas que estos poseen como la inhibición bacteriana. También la medicina ya que, en Guatemala, al igual que en muchas otras culturas, se valora la medicina tradicional basada en plantas, además de que el uso de aceites esenciales en la elaboración de medicamentos ha crecido exponencialmente. Finalmente, Guatemala exporta aceites esenciales a nivel internacional, ya que la calidad de estos productos a menudo los hace altamente demandados en el mercado global generando divisas para el país (García, 2022).

Entre los métodos más utilizados para la extracción de aceites esenciales, se encuentra la extracción por arrastre de vapor, debido a que este es un método en donde existe una clara

división entre la parte vegetal y el agua. El vapor de agua entra en contacto con la materia vegetal y son las hojas las que reciben el calor latente generado por el vapor de agua. Los aceites esenciales son sustancias volátiles e insolubles en el agua, pero que, gracias a la corriente de vapor, pueden ser arrastrados. La ventaja de utilizar la destilación por arrastre de vapor recae en la pureza del aceite obtenido al no utilizar un solvente o componente adicional en su obtención; además de ser un método de bajo costo a nivel industrial (Hidalgo, 2017).

Uno de los métodos no convencionales para la extracción de aceites esenciales es la extracción asistida por ultrasonido, debido a su mayor eficiencia y menos consumo de energía y agua, se ha convertido en una alternativa adecuada a los métodos de extracción convencionales y un método aprobado por procesar sustancias vegetales, especialmente compuestos con bajo peso molecular y este efecto aditivo del ultrasonido. Las ondas sonoras rompen las células vegetales y liberan su contenido al entorno de extracción; el ultrasonido genera ondas sónicas de intensidad específica y la amplitud en función de la frecuencia operativa. En el área experimental, el ultrasonido a baja potencia fue aplicado por la industria alimentaria para evaluar las propiedades fisicoquímicas de productos alimenticios tales como la composición y estructura y otras evaluaciones de control de calidad, mientras que el ultrasonido a alta potencia ha sido aplicado a una amplia gama de aplicaciones que incluyen cristalización, emulsificación, secado y procesos de congelación, así como la inactivación de enzimas (Guillén, 2022).

Otro método alternativo es el uso de enzimas para degradar tejidos vegetales, las enzimas son proteínas ideales para asistir en la extracción, modificación o síntesis de compuestos de origen natural (Puri, et al., 2012). La extracción enzimática se basa en la habilidad inerte de las enzimas de catalizar reacciones muy específicas y selectivas. Así como en la habilidad de funcionar en soluciones acuosas a pH y temperatura específicas. Las enzimas tienen la capacidad de degradar o desestabilizar las paredes celulares o membranas del tejido vegetal, favoreciéndolo y mejorando la extracción de compuestos, estudios recientes sobre la extracción asistida por métodos enzimáticos han demostrado una rápida extracción, alta recuperación y reducción de solvente, así como una disminución en la energía del proceso con respecto a los métodos sin asistencia enzimática (Sánchez, 2019).

Las propiedades antioxidantes de los aceites esenciales pueden proporcionar una serie de beneficios por lo que algunas de las razones para investigarlas recaen en que estas están relacionadas con las propiedades medicinales, ya que muchos aceites contienen compuestos con propiedades antioxidantes, que pueden tener beneficios para la salud, como enfermedades cardíacas, diabetes y algunos tipos de cáncer. También el hecho de estudiar las propiedades antioxidantes brinda como resultado la protección celular, ya que los antioxidantes presentes en los aceites esenciales pueden ayudar a proteger las células del daño causado por los radicales libres, esto es importante ya que el daño celular puede contribuir al envejecimiento prematuro y a diversas enfermedades. Finalmente, la capacidad antioxidante de los aceites esenciales puede aplicarse en la industria alimentaria ya que por esta propiedad los aceites esenciales son utilizados como conservantes naturales, ayudando a preservar los alimentos al inhibir la oxidación y por ende prolongar la vida útil (Acevedo, 2007).

IV. Objetivos

A. General

Realizar un análisis comparativo en los rendimientos y características de la obtención del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) mediante arrastre de vapor, ultrasonido y métodos enzimáticos.

B. Específicos

1. Evaluar los procesos y rendimientos de la obtención del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) con y sin el método aplicado para la mejora en la extracción.
2. Caracterizar el aceite esencial y agua floral obtenida en la extracción de tomillo (*Thymus vulgaris*) por cada método de extracción para evaluar su aplicación en la industria de alimentos.
3. Realizar una validación tecnológica en los métodos de extracción evaluados de los aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*).

V. Metodología (materiales y métodos)

A. Fase 1

Preparación de la muestra

Obtención de las muestras de tomillo:

Las muestras de tomillo fueron obtenidas por el proyecto ASPIRE, en donde el tomillo fue proveniente de parcelas comunitarias en la comunidad de Chaquijyá, Sololá.

Acondicionamiento de la materia prima:

Para extraer el aceite esencial del tomillo se acondicionó la materia prima de manera que se logró un proceso eficiente, para ello mediante el uso de varias pruebas se determinó que la mejor manera de obtener el aceite esencial fue secando la planta mediante el siguiente procedimiento:

Secado natural: bajo cobertizo por 6 días, sin contacto de luz solar.

Procedimiento de secado natural:

- Se dejó secar el tomillo en un lugar con sol indirecto.
- Se dejó el tomillo durante una semana.
- Hasta obtener una humedad de alrededor del 10%.

Se empleó el método descrito en “Extracción, caracterización y evaluación del efecto antimicrobiano a diferentes concentraciones del aceite, esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) en carne de pollo deshuesada almacenada en refrigeración.” (Viadurre, 2016).

Extracción de aceite esencial de tomillo mediante la destilación por arrastre de vapor

El aceite esencial de tomillo se extrajo de muestras secas de tomillo utilizando un alambique a escala de laboratorio. Haciendo pasar vapor de agua introduciéndolo por la parte inferior durante 150 min. El vapor de salida se condensó y el aceite se separó por decantación. Utilizando la metodología descrita por el centro de investigación agrícola y alimentaria de la Universidad del Valle de Guatemala.

Figura 3. Destilación por arrastre de vapor en alambique de laboratorio.



Extracción de aceite esencial de tomillo mediante uso métodos enzimáticos

Para la extracción de aceite esencial de tomillo se utilizó la enzima ViscozymeL para el pretratamiento antes de la extracción por arrastre de vapor utilizando a una concentración de un 1% de enzima por cada muestra a extraer.

Se empleó el método descrito en “Effect of enzyme pre-treatment on extraction yield and quality of cardamom (*Elettaria cardamomum maton*) volatile oil” (Baby, 2016).

En el que la solución de la enzima fue rociada con un atomizador por toda la materia prima dejandola incubar a una temperatura de 45 °C aproximadamente durante 1 hora, cumplido ese tiempo se procedio con la destilación por arrastre de vapor, hasta obtener el aceite esencial de tomillo.

Figura 4. Enzimas utilizadas para la extracción con pretratamiento enzimático.



Extracción de aceite esencial de tomillo mediante uso de ultrasonidos

Para la extracción de aceite esencial, se usó la materia prima secada anteriormente, utilizado 1 L de agua destilada y se efectuó el tratamiento previo por baño ultrasónico durante un periodo de 15 minutos, en un equipo Brasonic serie M1800-H, con una frecuencia de 40 Hz y una potencia de 145 W. Seguidamente una hidrodestilación. Dicho equipo se utilizó en la empresa APAESA, las imágenes se pueden encontrar en la sección de Anexos.

Se empleó el método descrito en “Enhancing the Extraction Process Efficiency of Thyme Essential Oil by Combined Ultrasound and Microwave Techniques.” (Gavrila, 2023).

Figura 5. Extracción de aceite esencial de tomillo con pretratamiento enzimático.



B. Fase 2

Caracterización del aceite esencial de tomillo e hidrolato.

Análisis del aceite esencial por GC/MS:

El aceite obtenido se analizó por GC/MS, para obtener así la identificación y cuantificación de sus compuestos. Para estos análisis cromatográficos se tomó 1mg del aceite esencial, se llevó a GC/MS, en un cromatógrafo de gases marca Agilent modelo 6850. El método que se utilizó es utilizando helio como gas portador, con un flujo de 1mL/min, las muestras se diluyeron en una relación 1:20 v/v con diclorometano y se inyectó 1microL en modo Split. La temperatura de la columna, el inyector y la línea de transferencia y se ajustó

en 50, 250 y 285 °C manteniéndose constante durante 1 min y luego se incrementó gradualmente hasta llegar a una temperatura de 110 °C, a una velocidad de 3 °C por minuto; se mantuvo nuevamente constante por 1 min, luego se incrementó la temperatura a 200 °C a una velocidad de 2 °C/min; manteniéndose inalterada por 1 min, finalmente se llevó a una temperatura de 250 °C, a una velocidad de 10 °C/min manteniéndose por 5 min. El detector de masas modelo 5975 y una columna capilar de polietilnglicol de 60 metros con un software ChemStation y una base de datos NIST.

Se empleó el método descrito en “Estudio de la calidad de aceites esenciales de orégano, tomillo y romero cultivados en Severino (El Carmen, Jujuy) recolectados en invierno y primavera” (Cáceres, 2021)

Índice de refracción:

Según el método 921.08AOAC (2007). Para la medición se utilizó el refractómetro Atago ABBE Nat-1T a una temperatura de 25 °C.

Densidad:

Se realizó la medición de la densidad del aceite esencial de tomillo mediante el uso de un densímetro marca Mettler Toledo D4.

Potencial antibacteriano:

Se evaluó la capacidad antibacteriana, ante los patógenos de *E. Coli* y *Salmonella*, del aceite esencial de tomillo y de su respectivo hidrolato mediante el uso de placas de Elisa.

Se empleó el método descrito en “Method for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review” (Balouiri, 2016).

Que consistió en:

- Se inoculó 1 pellet de cada cepa correspondiente de *E. Coli* y *Salmonella* en un Erlenmeyer de 250 mL de medio de cultivo líquido de infusión de cerebro y corazón (BHI).
- Ambas bacterias se incubaron por 24 horas a 37 °C en una incubadora manual de la marca VWR.
- A continuación, se preparó el medio de cultivo Mueller Hinton, para esto se disolvieron 0.60 g de extracto de carne, 10.62 g de peptona caseína, 0.9 g de almidón y 300 mg del indicador TTC en 300 mL de agua destilada para luego mezclar todo con un agitador magnético hasta asegurar que no había grumos.
- Posteriormente se prepararon los tubos de ensayo con 10 mL del cultivo en cada tubo, los cuales fueron esterilizados en una autoclave a 15 psi por una hora.
- Luego se prendió el mechero y se preparó el área de trabajo para asegurar la desinfección de esta. Se tomaron 1000 µL de la bacteria inoculada, se depositó en uno de los tubos de ensayo con agua peptonada, y se realizó las diluciones en tubos con

agua peptonada hasta tener una dilución $\times 10^2$ en donde en ese último tubo debía ser con el medio de cultivo Mueller Hinton.

- Ya con el tubo preparado de Mueller Hinton con la bacteria a trabajar, se realizó las diluciones tomando $100 \mu\text{L}$ del tubo de ensayo con la cepa a trabajar en cada uno de los pozos de la placa de Elisa. Luego se tomaron $100 \mu\text{L}$ del aceite esencial de tomillo y se depositó en el primer pozo de la placa de Elisa, se mezcló delicadamente y se traspasaron $100 \mu\text{L}$ de ese primer pozo al siguiente pozo, se repitió el procedimiento hasta llegar al doceavo pozo de la palca de Elisa. (Dicho procedimiento se llevó a cabo para cada una de las muestras de aceite esencial y de hidrolato a trabajar).
- Al finalizar con el sembrado de a placa, se identificó y se dejó incubar a 37°C por 24 horas para luego realizar la medición de absorbancias con el lector de placas.
- También se determinaba hasta qué punto de las diluciones existía la inhibición de manera visual por medio del indicador TTC.
- Un día antes, se dejaba incubar la bacteria a utilizar tomando 6 mL de la solución de cepa madre a un tubo con 10 mL de BHT para dejar incubar 24 horas a 37°C para ser utilizada en una nueva placa de Elisa.

Figura 6. Analisis de inhibición antibacterina realizado para las muestras de aceite esencial de tomillo y su respectivo hidrolato.



Capacidad antioxidante:

Se determinó la capacidad antioxidante tanto del aceite esencial de tomillo como del respectivo hidrolato mediante el uso de espectrometría con el uso de DPPH.

Se empleó el método descrito en “Use of free radical method to evaluate antioxidant activity” (Brand-Williams, 1995).

Que consistió en:

- Se preparó una solución de DPPH a 0.1M en etanol, pesando 39mg de reactivo DPPH y disolviéndolo en 50 mL de etanol. Luego se aforó a 100 mL con el solvente.
- Se diluyó 1 mL de DPPH preparado en 5 mL de agua.

- Se tomaron 5 g de la muestra a analizar en 50 mL de etanol y se dejaron mezclar con agitador magnético por media hora.
- Se tomaron 100 μL de la muestra a analizar en un tubo de ensayo y se prepararon 7 tubos más de forma ascendente hasta llegar a 700 μL en el último tubo.
- Luego se agregaron 2900 μL de etanol en el tubo con 100 μL de muestra, seguidamente se agregó etanol en forma descendente a cada tubo hasta llegar a 2300 μL en el último tubo, se agregaron 1000 μL de DPPH a cada tubo.
- Se dejaron reposar por 15 minutos en la oscuridad.
- Se leyeron las absorbancias a 515 nm y se calculó el índice de inhibición.

Figura 7. Analisis por DPPH de la capacidad antioxidante del aceite esencial de tomillo.



C. Fase 3

Análisis estadístico de los resultados entre el aceite esencial de tomillo y el respectivo hidrolato

Se realizó una prueba T para determinar si existe una diferencia significativa entre los resultados obtenidos de todas las pruebas realizadas para el aceite esencial y el respectivo hidrolato de tomillo.

VI. Resultados y discusión

Debido a la gran importancia de los aceites esenciales en Guatemala se procedió a realizar el análisis de las distintas pruebas fisicoquímicas realizadas sobre los aceites esenciales de tomillo extraídos así como también sobre los hidrolatos recolectados durante todas las distintas extracciones realizadas.

Tabla 6. Rendimientos y fracciones extraídas en las destilaciones de aceite esencial de tomillo extraídas por arrastre de vapor con y sin tratamiento enzimático.

Método	Arrastre de vapor (%)	Arrastre de vapor con enzimas (%)
Total	7.21 (100%) \pm 1.64	12.49(100%) \pm 2.82
Cabeza	23% \pm 0.34	29% \pm 1.70
Cuerpo	72% \pm 1.25	61% \pm 0.90
Cola	5% \pm 0.05	10% \pm 0.22
Rendimiento	0.29% \pm 0.005	0.36% \pm 0.03

Fuente: Propia a partir de las extracciones de aceite esencial de tomillo.

Tabla 7. Prueba T para las extracciones de aceite esencial de tomillo.

Hipótesis		Alpha	Valor P obtenido	Conclusión
Nula	Ho: $\mu_1 = \mu_2$	0.05	0.024	Se rechaza Ho
Alternativa	Hi: $\mu_1 \neq \mu_2$			

Fuente: Propia a partir del análisis estadístico realizado.

Como parte inicial de la experimentación del presente trabajo se realizaron distintas pruebas para la extracción de del aceite esencial de tomillo. Se iniciaron las pruebas utilizando una destilación por arrastre de vapor mediante el uso de un destilador de doble fase; en donde en un primer tanque se produjo vapor a una temperatura de 96 °C conduciéndose hacia el material vegetal seco en donde por el arrastre de vapor provocado se consigue la obtención de todos los componentes volátiles del tomillo mezclándose con el vapor de agua que luego pasan a un condensador para así poder obtener el aceite esencial de tomillo con el respectivo hidrolato de tomillo. Como se puede observar en la Tabla 6, para estas destilaciones se obtuvo en promedio 7.21g \pm 1.64 que representa a un 100% de las fracciones obtenidas durante la destilación; ya que la cabeza del aceite que es la primera fase que se obtiene del aceite durante la primera hora de extracción, representa a un 23% \pm 0.34, el cuerpo a un 72% \pm 1.25 y la cola a un 5% \pm 0.05, en donde la cabeza representa a la primera fracción obtenida en la destilación, el cuerpo a la fracción que se obtiene luego de la primera hora de extracción y la cola al aceite obtenido en la última media hora de extracción. Siendo esto satisfactorio pues en las destilaciones de aceites esenciales es de gran importancia que la fracción del cuerpo obtenida sea la que se obtenga en mayor proporción en la destilación; puesto que esta es la que mejores características de aroma y sabor posee el aceite (Viadurre, 2016).

Ahora bien, al momento de realizar las extracciones de aceite esencial de tomillo mediante arrastre de vapor, pero esta vez utilizando un pretratamiento enzimático se utilizó la enzima Viscozyme L en una concentración del 1% que está constituida por Arabanasa, celulasa, β -glucanasa, hemicelulosa, xilanasas y pectinasa. El tratamiento se llevó a cabo a una temperatura de 45 °C durante 45 minutos en donde se obtuvo en promedio $12.49\text{g} \pm 2.82$ de aceite esencial de tomillo que representa al 100% de las fracciones obtenidas, en donde la cabeza obtenida representó a un $29\% \pm 1.70$, el cuerpo a un $61\% \pm 0.90$ y la cola a un $10\% \pm 0.22$. Como se puede apreciar en este caso la fracción obtenida al inicio que es la cabeza es mayor en comparación a la destilación por arrastre de vapor sin la utilización de un método enzimático. Esto debido a que por acción de la hemicelulasa en el método enzimático se consigue una descomposición de las paredes celulares del tomillo obteniendo así las fracciones de aceite esencial en una primera instancia de manera más rápida debido a que en la extracción por arrastre de vapor, se llevó un tiempo de 5 horas en recolectar todo el aceite, mientras que en la extracción asistida por enzimas se llevó a cabo en 4.5 horas, dando como resultado una obtención de la fracción de la cabeza mayor a la de la destilación sin un tratamiento enzimático previo. Es importante mencionar que la utilización de la enzima Viscozyme L fue de gran influencia en la destilación pues como ya se mencionó anteriormente al contener hemicelulasa esta degrada las paredes vegetales del tomillo obteniendo así una mayor concentración de aceite esencial; y al contener arabanasa y xilanasas que son las encargadas de degradar la arabinosa y xilosa obtenidas de la degradación de la pared celular del tomillo estas también influyen de manera positiva en la extracción del aceite esencial. Finalmente, la glucanasa contenida en la mezcla de enzimas ayuda de gran manera a la descomposición del material vegetal ya que descompone la celulosa de las plantas que esta de igual manera presente en la pared celular del tomillo; además de la pectinasa que es de gran importancia para descomponer las pectinas en baja concentración que pudiera contener el tomillo (Sánchez, 2019).

También al evaluar los rendimientos de extracción para los dos métodos en la extracción del aceite esencial de tomillo se puede observar que el rendimiento promedio para la obtención de aceite esencial mediante el uso de arrastre de vapor fue de $0.29\% \pm 0.005$ y para la extracción de aceite esencial utilizando el método pre enzimático se obtuvo un rendimiento promedio de $0.36\% \pm 0.03$ en donde se pudo apreciar que si existió un incremento en el rendimiento de extracciones debido al uso de enzimas; ya que como se mencionó el uso de la enzima Viscozyme L ayuda en gran medida a la degradación de las paredes celulares del tomillo obteniendo una mayor cantidad de aceite en la destilación del mismo. Pero para determinar si realmente existe una diferencia significativa en las dos metodologías usadas fue necesario realizar una prueba T como se observa en la Tabla 7; en donde se tomaron como supuestos una hipótesis inicial que indicaba que las medias de los rendimientos obtenidos son iguales, y una hipótesis alternativa en donde las medias de los rendimientos no son iguales.

Fue así en donde se obtuvo un valor p de 0.024 que al ser menor al Alpha utilizado de 0.05 se puede identificar que, si existe una diferencia significativa en los rendimientos obtenidos para el arrastre de vapor simple y para el arrastre de vapor utilizando un método enzimático, favoreciendo al método enzimático ya que este presentó tener un aumento en el rendimiento de alrededor del 0.07%. Si bien se obtuvo una mejora en los rendimientos de los aceites esenciales de tomillo es importante mencionar que según la teoría el tomillo tiene un

rendimiento de extracción que va de 0.7-1% como máximo por lo que si bien se obtuvo una mejora en los rendimientos de extracción es importante seguir experimentando con la concentración de enzima utilizada para poder obtener un mayor rendimiento en las extracciones; ya que en muchas ocasiones existe factores de la planta como su humedad inicial el tiempo en que estuvo almacenada la materia prima y también la temperatura de destilación que se llevó a cabo el proceso que son factores de alto impacto para el rendimiento de una extracción (Antezana Ruiz, 2017).

Finalmente, se realizaron pruebas para la destilación de aceite esencial de tomillo utilizando un tratamiento de vibración ultrasónica seguido de una hidrodestilación a bajas temperaturas con presiones controladas; utilizando intervalos de vibración de 30 segundos con 10 segundos de descanso por un periodo de tiempo de 15 minutos utilizando agua como solvente y aislamiento térmico a una temperatura de 50 °C usando un equipo LAWSON Scientific. Ahora bien, en la destilación se utilizó una temperatura de 60 °C en donde la materia estaba en contacto directo con el solvente, en este caso agua. Si bien, la sonicación produce un efecto de cavitación que hace que las membranas celulares del tomillo se rompan y que las paredes celulares del mismo se vean en descomposición, para el tomillo en efecto esta sonicación a las condiciones dadas combinada con la hidrodestilación no produjo resultados cuantificables pues las fracciones de aceite esencial obtenidas no pudieron ser recolectadas y por ende analizadas (Gavrila, 2023). Por lo que se recomienda utilizad tiempos de sonicación mayores a frecuencias mayores pues en este caso se utilizó una frecuencia de 23.70 KHz que para el tomillo en específico no fue satisfactoria la evaluación.

Tabla 8. Caracterización del aceite esencial de tomillo obtenido mediante arrastre de vapor.

Aceite esencial de tomillo		
Componente	Tiempo de retención	Área relativa (%)
Timol	50.964	15.71
Carvacrol	18.209	17.51
p-cimeno	18.714	16
Linalol	20.062	4.37
Borneol	31.432	0.51
β-Terpineno	26.083	0.84
Camfeno	11.427	1.39
Cineol (Eucaliptol)	16.549	7.41
γ-terpineno	31.75	1.79

Fuente: Propia a partir de la cromatografía del aceite esencial de tomillo.

Tabla 9. Caracterización del aceite esencial de tomillo obtenido mediante arrastre de vapor asistido por enzimas.

Aceite esencial de tomillo con método enzimático		
Componente	Tiempo de retención	Área relativa (%)
Timol	50.968	16.93
Carvacrol	18.114	16.7
p-cimeno	18.659	15.62
Linalol	29.035	3.58
Borneol	35.28	2.91
β -Terpineno	31.746	1.56
Camfeno	11.427	0.84
Cineol (Eucaliptol)	16.513	6.62
γ -terpineno	15.344	3.19

Fuente: Propia a partir de la cromatografía del aceite esencial de tomillo.

Tabla 10. Caracterización del hidrolato de tomillo obtenido mediante arrastre de vapor.

Hidrolato de tomillo		
Componente	Tiempo de retención	Área relativa (%)
Agua	10.39	97.73
Timol	50.891	2.27

Fuente: Propia a partir de la cromatografía del hidrolato de tomillo.

Tabla 11. Caracterización del hidrolato de tomillo obtenido mediante arrastre de vapor asistido por enzimas.

Hidrolato de tomillo con método enzimático		
Componente	Tiempo de retención	Área relativa (%)
Agua	10.39	99.06
Timol	50.891	0.94

Fuente: Propia a partir de la cromatografía del hidrolato de tomillo.

Ahora bien, al realizar el análisis para la caracterización de los compuestos volátiles de los aceites esenciales de tomillo obtenidos tanto por arrastre de vapor como por arrastre de vapor asistido por enzimas, se obtuvieron las concentraciones más elevadas tanto en el tiempo de retención como para el área de los cromatogramas obtenidos, como se puede ver en las tablas 7 y 8, se obtuvo una proporción de timol del 15.71%, carvacrol de 17.51% y p-

cimeno de 16% para el aceite sin tratamiento enzimático y para el aceite obtenido con un tratamiento enzimático se obtuvo una concentración de timol de 16.93%, carvacrol de 16.7% y de p-cimeno de 15.62% siendo estos los compuestos mayoritarios en el aceite esencial de tomillo. Siendo esto positivo para la caracterización de los aceites pues demuestra la pureza de estos ya que se encuentran en los rangos que la literatura indica para dicho aceite, siendo esto favorable pues la concentración de carvacrol y timol son los responsables de dar las características destacadas al aceite esencial de tomillo, dichos resultados están de acuerdo con los hallazgos de (Cáceres, 2021).

También, se realizó la caracterización para los hidrolatos por cada método empleado para la extracción del aceite, como se observa en las tablas 9 y 10 se obtuvo una proporción de 97.73% de agua y del 2.27% para el timol en el hidrolato obtenido sin un método enzimático. Se obtuvo una proporción del 99.06% de agua y de 0.94% de timol, siendo estos resultados favorables pues como indica la literatura no se espera obtener gran proporción de compuestos volátiles; pero al tener una cantidad de timol es posibles determinar que estos hidrolatos puedan poseer ciertas propiedades del aceite esencial de tomillo como la capacidad antibacteriana que se evaluara más adelante.

Tabla 12. Capacidad antioxidante media del aceite esencial de tomillo obtenido mediante la destilación por arrastre de vapor con y sin método enzimático.

Método	Arrastre de vapor	Arrastre de vapor asistido por enzimas
IC 50	100.949 ± 3.43	201.53 ± 4.80

Fuente: Propia a partir del análisis de antioxidantes para el aceite esencial de tomillo.

Tabla 13. Prueba T para la capacidad antioxidante de aceite esencial de tomillo obtenido.

Hipótesis		Alpha	Valor P obtenido	Conclusión
Nula	Ho: $\mu_1 = \mu_2$	0.05	0.001	Se rechaza Ho
Alternativa	Hi: $\mu_1 \neq \mu_2$			

Fuente: Propia a partir del análisis estadístico realizado.

La medición de la capacidad antioxidante del aceite esencial de tomillo obtenido por arrastre de vapor con y sin método enzimático es de gran importancia pues esto nos indica la capacidad para combatir los radicales libres y proteger las células del daño oxidativo. Como se puede observar en la Tabla 12, se obtuvo la capacidad antioxidante del aceite esencial obtenido por arrastre de vapor con y sin un tratamiento enzimático expresada en valores de IC50 en donde podemos observar que para el aceite esencial obtenido por arrastre de vapor fue de 100.949 mg/ml ± 3.43 y para el aceite esencial obtenido por arrastre de vapor asistido por enzimas se obtuvo un IC50 de 202.53 mg/ml ± 4.80. Esto indicando que la capacidad antioxidante del aceite esencial de tomillo obtenido mediante el arrastre de vapor posee una mayor capacidad antioxidante que el aceite obtenido mediante el método enzimático; esto debido a que al momento de realizar la extracción del aceite esencial de tomillo mediante el

uso de un tratamiento enzimático la mezcla de enzimas de Viscozyme L afectaron a los componentes antioxidantes presentes en el tomillo, esto debido a la temperatura de incubación de la enzimas pudiendo permitir la degradación de los componentes antioxidantes presentes en el tomillo. De igual manera se considera que la capacidad antioxidante de los aceites esenciales obtenidos es baja debido a que se necesitan alrededor de 100 a 200 mg/ml para inhibir el 50% de un proceso oxidativo ocasionado por radicales libres de otras sustancias ya que estudios previos realizados se han obtenido IC50 para el aceite esencial de tomillo de alrededor de 0.86 mg/ml. Pudiendo evaluar que la calidad respecto a la materia prima utilizada no fue la adecuada respecto a la capacidad antioxidante del aceite esencial. Finalmente, al evaluar la capacidad antioxidante de los hidrolatos obtenidos en ambas metodologías de extracción del aceite; se determinó que estos no poseen ninguna capacidad antioxidante, por compuestos casi en su totalidad por agua no poseen ninguna capacidad antioxidante tanto de manera teórica como experimentalmente (Barzegar, 2016) (Dalzotto, 2022).

Tabla 14. Índice de refracción del aceite esencial de tomillo.

Método utilizado	
Arrastre de vapor	Arrastre de vapor + enzimas
1.4908 ± 0.0003	1.4901 ± 0.0001

Fuente: Propia a partir del análisis de índice de refracción del aceite esencial de tomillo.

Tabla 15. Prueba T para el índice de refracción del aceite esencial de tomillo obtenido.

Hipotesis		Alpha	Valor P obtenido	Conclusión
Nula	Ho: $\mu_1 = \mu_2$	0.05	0.012	Se rechaza Ho
Alternativa	Hi: $\mu_1 \neq \mu_2$			

Fuente: Propia a partir del análisis estadístico realizado.

Al realizar la evaluación de las características fisicoquímicas del aceite esencial de tomillo obtenido se observa en la Tabla 14, que el índice de refracción promedio obtenido se encuentra en 1.4908 con una desviación estándar de 0.0003 para el aceite obtenido por medio de la destilación por arrastre de vapor; ahora bien, para el aceite obtenido mediante la destilación por arrastre de vapor asistida por enzimas se obtuvo un índice de refracción promedio de 1.4901 con una desviación estándar de 0.0001. Al obtener valores de desviaciones estándar tan bajas como lo son estos se puede determinar que no existe una variación significativa o dispersión de los datos obtenidos. Es importante mencionar que al obtener índices de refracción experimentales de 1.4908 y de 1.4091 respectivamente para cada método de destilación empleados nos indican que la pureza del aceite es muy buena y acertada, al comparar dichos índices con el valor teórico que oscila entre 1.490-1.515 estos se encuentran dentro del rango. De igual manera en el aceite esencial de tomillo obtenido con la enzima Viscozyme L se puede confirmar que el uso de esta misma no crea adulteraciones en el aceite dando valores del índice de refracción fuera del rango deseado, ya que como se sabe se desea que no existan adulteraciones pues en los aceites esenciales dicha cualidad es

de gran importancia para las demás características de los mismos, como en su capacidad antioxidante ya que si existieran variaciones en el índice de refracción (Cáceres, 2021).

Tabla 16. Densidad del aceite esencial de tomillo.

Método utilizado	
Arrastre de vapor	Arrastre de vapor + enzimas
0.903 ± 0.006	0.901 ± 0.015

Fuente: Propia a partir del análisis de densidad del aceite esencial de tomillo.

Tabla 17. Prueba T para la densidad del aceite esencial de tomillo obtenido.

Hipotesis		Alpha	Valor P obtenido	Conclusión
Nula	Ho: $\mu_1 = \mu_2$	0.05	0.883	No se rechaza Ho
Alternativa	Hi: $\mu_1 \neq \mu_2$			

Fuente: Propia a partir del análisis estadístico realizado.

También al evaluar la densidad de los aceite esenciales de tomillo obtenidos se puede observar en la Tabla 16, que se obtuvo una densidad promedio de 0.903 g/ml con una desviación estándar de 0.006 para el aceite esencial de tomillo obtenido por la destilación con arrastre de vapor y para el aceite obtenido por la destilación por arrastre de vapor asistido por el método enzimático se obtuvo una densidad promedio de 0.901 g/ml con una desviación estándar de 0.015, obteniendo estas desviaciones aún muy bajas que indican que no existe una dispersión significativa en los datos obtenidos de cada corrida. Ahora bien, al obtener densidades promedio de 0.903 y 0.901 g/ml se pueden decir que estas se encuentran dentro del rango esperado, al compararlas con el valor teórico que oscila entre 0.850-0.950 g/ml determinado que la pureza de los aceites es alta y que estos no han sido adulterados de ninguna manera (Cáceres, 2021).

Tabla 18. Factores de dilución de inhibición antibacteriana para patógenos *E. coli* y *Salmonella*.

	<i>Salmonella</i> (4.56E+06 UFC/ml)	<i>E. coli</i> (2.54E+05 UFC/ml)
Muestra	FD 1	FD 2
Aceite esencial de tomillo sin pretratamiento enzimático	1:64	1:128
Hidrolato de tomillo sin pretratamiento enzimático	1:32	1:128
Aceite esencial de tomillo con pretratamiento enzimático	1:32	1:128
Hidrolato de tomillo con pretratamiento enzimático	1:64	1:32

Fuente: Propia a partir del análisis de capacidad antibacteriana del aceite esencial de tomillo y del hidrolato.

Finalmente, se realizó la evaluación de la capacidad antibacteriana de los aceites esenciales de tomillo recolectados y de sus respectivos hidrolatos contra los patógenos *E. coli* y *Salmonella* con el fin de evaluar si estos podían inhibir el crecimiento de las mismas cepas, utilizando trifenil tetrazolio de cloruro como un indicativo del crecimiento de las cepas mostrando una coloración rojiza si existe crecimiento de la cepas, utilizando diferentes diluciones de los aceites obtenidos por arrastre de vapor con y sin tratamiento enzimático, así como de los respectivos hidrolatos en placas de Elisa. Dichos resultados se obtuvieron con espectrofotómetro con lector de placas de Elisa a una longitud de onda de 630 nm en donde se obtuvieron resultados para el crecimiento para la cepa de *E.coli* como se puede observar en la tabla 18 de factores de dilución de 1:64 para el aceite obtenido por arrastre de vapor sin método enzimático y de 1:32 para el hidrolato de tomillo sin tratamiento enzimático y para el aceite esencial obtenido con método enzimático, y 1:32 para el hidrolato con un pretratamiento enzimático se obtuvo un factor de dilución de 1:64 utilizando la cepa de *E.coli* a concentración de $2.54E+05$ UFM/ml ± 0.020 (López Ambrocio, 2015).

Ahora bien, al momento de evaluar la inhibición de las distintas muestras frente a la cepa de *Salmonella* en donde para el aceite esencial de tomillo sin tratamiento enzimático se obtuvo una inhibición del crecimiento bacteriano hasta un factor de dilución 1:128 y para las muestras de hidrolato de tomillo y aceite esencial de tomillo con un tratamiento enzimático se obtuvo una inhibición hasta el factor de dilución 1:128 de igual manera y finalmente para la muestra de hidrolato con tratamiento enzimático, se obtuvo una inhibición hasta el factor de dilución de 1:32 utilizando la cepa de *Salmonella* en una concentración de $4.56E+06$ UFM/ ml ± 0.447 . Es importante mencionar que aunque los factores de dilución entre las cepas de *E.coli* y *Salmonella* resultaron ser similares no son las mismas puesto que la cepa de *E.coli* se encontraba en una dilución mayor; indicando que la acción del carvacrol y timol contenidos en las muestras de aceite esencial e hidrolato de tomillo poseen una mayor acción antibacteriana para la cepa de *Salmonella*, Indicado que estos aceites junto con sus hidrolatos podrían utilizarse como agentes antimicrobianos únicamente con la diferencia de concentración del aceite para cada una de las cepas, siendo este mayor para *E.coli*, también es de gran importancia mencionar que para la inhibición de las cepas mencionadas se contó con una concentración relativa de 15.71% para el timol, 17.51% para el carvacrol y 16% para el p-cimeno respecto a la muestra utilizada de aceite esencial de tomillo obtenido por arrastre de vapor. Ahora bien, para el aceite esencial de tomillo obtenido con el tratamiento enzimático se utilizó una concentración relativa a la muestra de 1.93% de timol, 16.7% de carvacrol y 15.62% de p-cimeno y para los hidrolatos se contó con una concentración relativa de 2.27% y 0.94% de timol que son los agentes antibacterianos activos para la inhibición antibacteriana (López Ambrocio, 2015).

VII. Conclusiones

1. Se determinó que el pretratamiento enzimático utilizado la enzima ViscozymeL a una concentración del 1% es con la que se obtuvo una mayor cantidad de aceite esencial con un incremento del 0.1% respecto a la extracción por arrastre de vapor sin el tratamiento, igualmente con el tratamiento ultrasónico seguido de la hidrodestilación no se lograron obtener resultados cuantificables para el tomillo indicando que la extracción de aceite esencial no mejoró con la aplicación de un pretratamiento ultrasónico.
2. Se determinó que los compuestos como el timol, carvacrol y p-cimeno fueron los que estuvieron presentes en mayor proporción en el aceite esencial de tomillo y en hidrolato recolectados el timol fue el único compuesto que se encontró presente siendo estos los compuestos volátiles que se pueden obtener.
3. Se determinó que el aceite esencial de tomillo posee una baja capacidad antioxidante siendo esta de 100.949 ± 3.43 para el aceite obtenido por arrastre de vapor y de 201.53 ± 4.80 para el aceite esencial obtenido con un tratamiento enzimático, teniendo una menor capacidad antioxidante el aceite con tratamiento enzimático y teniendo una diferencia significativa en la capacidad antioxidante por el método empleado.
4. El aceite esencial obtenido por los dos métodos evaluados presentó tener una pureza alta ya que se encuentran dentro de los rangos aceptables tanto para el índice de refracción como para la densidad.
5. Es posible utilizar el aceite esencial de tomillo y del hidrolato como un agente antibacteriano para los patógenos *E.coli* y *Salmonella* pues estos poseen una alta capacidad antibacteriana para el crecimiento de dichas cepas.

VIII. Recomendaciones

1. Realizar la combinación del pretratamiento ultrasónico con la destilación por arrastre de vapor con el fin de determinar si la combinación de los dos métodos brinda resultados cuantificables para la materia prima evaluada.
2. Luego de haber obtenido y evaluado exitosamente la capacidad antibacteriana del aceite esencial de tomillo, se recomienda aplicar del alcance de dicha capacidad contra todo tipo de patógenos presentes en alimentos al igual que del hidrolato.
3. Diseñar un sistema de microaspersión para la aplicación del aceite esencial de tomillo y el respectivo hidrolato como agente antibacteriano en alimentos con alto riesgo a ser contaminado por los patógenos evaluados en la investigación.
4. Comparar la actividad antibacteriana y antioxidante del aceite esencial de tomillo obtenido en una matriz alimenticia contra preservantes de origen sintético.
5. Realizar pruebas de extracción utilizando un método de fermentación con levaduras seguida de una destilación por arrastre de vapor para determinar si existe una mejora en el rendimiento de extracción para el aceite esencial de tomillo.

IX. Bibliografía

- Acevedo, A. M., Castañeda, M. L., Blanco, K. M., Cardenas, C. Y., Reyes, J. A., Kouznetsov, V. V., & Stashenko, E. E. (2007). *Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol*. *Scientia et Technica*, 13(33), 125-128.
- AGEXPORT. *Guía de exportación de Tomillo (Thymus vulgaris)*. Recuperado de: <https://www.export.com.gt/documentos/guia-de-cultivos/guia-de-cultivo-de-tomillo.pdf>
- Antezana Ruiz, B. F. (2017). *Obtención de aceite esencial e hidrolato de hierbabuena (Mentha Spicata) mediante el proceso de destilación por arrastre con vapor* (Doctoral dissertation).
- Alejandra Arriguí-Suarez, M., Esteban Domínguez-Valle, D., Camilo Giraldo-Contreras, A., Alejandra Rojas-Giraldo, M., Camila Sepúlveda-Zuluaga, M., & Ríos-Vásquez, E. (2022). *EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE ZINGIBER OFFICINALE (JENGIBRE), POR HIDRODESTILACIÓN ACOPLADA A CLEVANGER Y ASISTIDA POR MICROONDAS, CON Y SIN TRATAMIENTO PREVIO CON ULTRASONIDO*. *Journal of Research of the University of Quindío*, 34.
- Argote-Vega, F. E., SUAREZ-MONTENEGRO, Z. J., TOBAR-DELGADO, M. E., PEREZ-ALVAREZ, J. A., HURTADO-BENAVIDES, A. N. D. R. E. S., & DELGADO-OSPINA, J. O. H. A. N. N. E. S. (2017). *Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en Staphylococcus aureus y Escherichia coli*. *Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial*, 15(SPE2), 52-60.
- Azuola, R., & Vargas-Aguilar, P. (2007). *Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA)*. *Revista Tecnología en marcha*, 20(4).
- Baby, K. C., & Ranganathan, T. V. (2016). *Effect of enzyme pre-treatment on extraction yield and quality of cardamom (Elettaria cardamomum maton.) volatile oil*. *Industrial Crops and Products*, 89, 200-206.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). *Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review*. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71-79.
- Barzegar, M., Ghaderi Ghahfarokhi, M., Sahari, M. A., & Azizi, M. H. (2016). *Enhancement of thermal stability and antioxidant activity of thyme essential oil by encapsulation in chitosan nanoparticles*. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 18(7), 1781-1792.
- Boom, E. A., Orozco, J. A., Alean, J. D., & Rojano, B. (2018). *Evaluación de la actividad antioxidante de aceites esenciales de eucaliptos cultivados en Colombia*. *Información tecnológica*, 29(6), 57-66.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. *Use of free radical method to evaluate antioxidant activity*. Lebensm. Wiss. Technol 22, 25-30, 1995.

Cáceres, B., Rozo, V., & García, E. (2021). *Estudio de la calidad de aceites esenciales de orégano, tomillo y romero cultivados en Severino (El Carmen, Jujuy) recolectados en invierno y primavera*. Revista Científica FCA, 14(1), 7-18.

Casado Villaverde, I. (2018). Optimización de la extracción de aceites esenciales por destilación en corriente de vapor.

Chamorro, R. A. M., Condori, S. Q., Vidal, M. R. Q., & Cárdenas, S. K. B. (2010). *Evaluación de la capacidad antimicrobiana del aceite esencial de orégano (Origanum vulgare) microencapsuladas en β -ciclodextrina aplicados en cultivos microbianos*. Revista de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos, 1(1).

Cotera Curi, Y. R., & Yauri Cantorin, F. A. (2018). *Influencia de la presión y temperatura en la extracción de aceite esencial Inka Muña (Satureja inkana) por CO₂ supercrítico*.

Dalzotto, D. C., Piñuel, M. L., Failla, M., Sharry, S. E., & Boeri, P. A. (2022). *Capacidad antioxidante de aceites esenciales de TOMILLO DE CAMPO (Acantholippia seriphioides A. Gray)*.

García Guzmán, K. R. (2022). *Diseño de investigación programa de implementación de la metodología kaizen para la solución de entrega de producto fuera de tiempo establecido, en un laboratorio de producción de aceites esenciales ubicado en la ciudad de Guatemala* (Doctoral dissertation, Universidad de San Carlos de Guatemala).

García Jara, J. T. (2017). *Extracción de aceite esencial por fluidos supercríticos y arrastre con vapor de cedrón (aloesia triphylla) en la región Arequipa*.

Gavrila, A. I., Chisega-Negrila, C. G., Maholea, L., Gavrila, M. L., Parvulescu, O. C., & Popa, I. (2023). *Enhancing the Extraction Process Efficiency of Thyme Essential Oil by Combined Ultrasound and Microwave Techniques*. Agronomy, 13(9), 2331.

Guillén Cañavi, M. J. (2022). *Aplicación del ultrasonido en la extracción por hidrodestilación y microondas de aceite esencial de cáscara de limón (Citrus aurantifolia)*.

Esquivel, A., & Aguilar, P. V. (2007). *Uso de aceites esenciales extraídos por medio de fluidos supercríticos para la elaboración de alimentos funcionales*. Tecnología en marcha, 20(4), 7.

Hidalgo Masías, G. L., & Romero Faya, A. B. (2017). *Diseño de una planta piloto para la extracción de aceites esenciales mediante destilación por arrastre de vapor*.

Materias primas aromáticas naturales. Vocabulario, Norma UNE-EN ISO 9235:2013.

Medina Recinos, K. M. (2022). *Formulación y caracterización del producto cosmético aceite de Aloe vera, utilizando extracto de Aloe vera (Aloe barbadensis) y aceite de coco (Cocos nucifera L.) como aceite portador, obtenido con maceración dinámica a reflujo, a escala laboratorio* (Doctoral dissertation, Universidad de San Carlos de Guatemala).

Méndez, I. A., Badillo, C. A., Parra, G. O., & Faccini, Á. A. (2011). *Caracterización microbiológica de Salmonella en alimentos de venta callejera en un sector universitario de Bogotá, Colombia*. Julio a octubre de 2010.

López Ambrocio, R. M., & LOPEZ AMBROCIO, R. M. (2015). *Actividad antimicrobiana del aceite esencial de tomillo (Thymus vulgaris L)* (Master's thesis).

López De La Cruz, R. P., & Caso Orihuela, N. V. (2015). *Rendimiento y composición química de aceites esenciales de Eucalyptus archeri y Schinus molle-Valle del Mantaro*.

Ortega Romero, E. C. (2015). *Obtención del aceite vegetal de Euterpe precatoria Mart. (Asai) por diferentes métodos de extracción: evaluación del rendimiento y calidad (características físico-químicas, actividad antioxidante y estabilidad)*.

Ortiz Restrepo, A. F., & Mejía Botero, H. A. (2021). *Extracción de aceites esenciales de sustratos vegetales termolábiles mediante arrastre con solventes orgánicos*.

Palma, M. & Barroso, C.G. 2001. "Ultrasound-assisted extraction and determination of tartaric and malic acids from grapes and winemaking by-products" *Analytica Chimica Acta*. N° 458: 119-130

Palomarez Ardila, B., & Perdomo Acevedo, D. (2015). *Extracción y evaluación de rendimientos de los aceites esenciales del árbol aniba perutilis hemsley (comino) mediante el método de arrastre con vapor*.

Puri M, Sharma D, Barrow CJ. 2012. *Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants*. *Trends in Biotechnology* 30:37–44.

Rodríguez-Álvarez, M., Alcaráz-Meléndez, L., Real-Cosío, S. 2012. *Procedimientos para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas*. Edit. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, Baja California Sur, México. 38 p.

Sánchez Madrigal, M. Á. (2019). *Extracción y caracterización de fructanos a partir de plantas de sotol (Dasylirion spp.) y agave (Agave tequilana Weber var. azul) mediante métodos enzimáticos asistidos con tecnologías de ultrasonido y su aplicación en alimentos* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).

Soler-Gallardo, R. (2021). *EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDOS DE COMPUESTOS DE VALOR AÑADIDO*.

Stanciuc Stanciuc, V. (2013). *Extracción y caracterización de aceite esencial de Jengibre (Zingiber officinalis)*.

Vargas Aspíllaga, J. O. D. (2019). *Programa de envío al mercado extranjero para exportar el aceite esencial de limón de los productores del distrito de olmos.*

Vidaurre Carlos, J. M., & Tello Jiménez, F. E. (2016). *Extracción, caracterización y evaluación del efecto antimicrobiano a diferentes concentraciones del aceite, esencial de tomillo (Thymus vulgaris) en carne de pollo deshuesada almacenada en refrigeración.*

Zenteno Vázquez, M. E. (2013). *Extracción del aceite de la almendra de durazno predigerida con enzimas.*

X. Anexos

Tabla 19. Extracción de aceite esencial de tomillo mediante arrastre de vapor.

No. Prueba	Fracción	Peso (g)	Fracción	Peso (g)	Fracción	Peso (g)	Aceite obtenido	Peso (g)	Rendimiento extracción	Porcentaje (%)
1	Cabeza	1.747	Cuerpo	5.8641	Cola	0.3795	Total	7.9901	Rendimiento 1	0.30
2	Cabeza	1.891	Cuerpo	6.0294	Cola	0.4108	Total	8.3314	Rendimiento 2	0.29
3	Cabeza	1.238	Cuerpo	3.78	Cola	0.3109	Total	5.3269	Rendimiento 3	0.30
	Promedio	1.63	Promedio	5.22	Promedio	0.367066667	Promedio	7.22	Promedio	0.2931
	Desviación estándar	0.34	Desviación estándar	1.25	Desviación estándar	0.051097391	Desviación estándar	1.64	Desviación estándar	0.0050

Tabla 20. Extracción de aceite esencial de tomillo mediante arrastre de vapor con método enzimático.

No. Prueba	Parámetro	Peso (g)	Fracción	Peso (g)	Fracción	Peso (g)	Fracción	Peso (g)	Aceite obtenido	Peso (g)	Rendimiento Extracción	Porcentaje (%)
1	Enzima utilizada	38.5	Cabeza	3.8192	Cuerpo	7.9124	Cola	1.2893	Total	13.0209	Rendimiento 1	0.33821
2	Enzima utilizada	42.5	Cabeza	5.1779	Cuerpo	8.4812	Cola	1.3422	Total	15.0013	Rendimiento 2	0.35297
3	Enzima utilizada	23.5	Cabeza	1.7984	Cuerpo	6.7098	Cola	0.9384	Total	9.4466	Rendimiento 3	0.40198
	Promedio	34.83	Promedio	3.60	Promedio	7.70	Promedio	1.19	Promedio	12.49	Promedio	0.36
	Desviación estándar	10.02	Desviación estándar	1.70	Desviación estándar	0.90	Desviación estándar	0.22	Desviación estándar	2.82	Desviación estándar	0.03

Tabla 21. Índice de refracción del aceite esencial de tomillo recolectado.

Método utilizado	
Arrastre de vapor	Arrastre de vapor + enzimas
1.4905	1.4900
1.4909	1.4901
1.4910	1.4902
1.4908 ± 0.003	1.4901 ± 0.0001

Tabla 22. Densidad del aceite esencial de tomillo recolectado.

Método utilizado	
Arrastre de vapor	Arrastre de vapor + enzimas
0.900	0.888
0.910	0.918
0.899	0.898
0.903 ± 0.006	0.901 ± 0.015

Tabla 23. IC50 para antioxidantes del aceite esencial de tomillo recolectado.

Método	Arrastre de vapor	Arrastre de vapor asistido por enzimas
IC50	98.53	204.93
IC50	103.37	198.14
IC 50 Promedio	100.949 ± 3.43	201.53 ± 4.80

Tabla 24. Resultado para la capacidad antioxidante del aceite esencial de tomillo obtenido por arrastre de vapor.

Duplicado A			
Lectura 30'	Absorbancia- Blanco	mg aa/ml	% pérdida a 30'
1.021	1.021	2.5269	25.80
0.858	0.858	5.0537	37.65
0.711	0.711	7.5806	48.33
0.630	0.630	10.1074	54.22
0.565	0.565	12.6343	58.94
0.513	0.513	15.1611	62.72
0.454	0.454	17.6880	67.01
IC50	98.54 mg muestra/ml		

Tabla 25. Resultado del duplicado para la capacidad antioxidante del aceite esencial de tomillo obtenido por arrastre de vapor.

Duplicado B			
Lectura 30'	Absorbancia-Blanco	mg aa/ml	% pérdida a 30'
1.042	1.042	2.5269	24.27
0.852	0.852	5.0537	38.08
0.751	0.751	7.5806	45.42
0.658	0.658	10.1074	52.18
0.581	0.581	12.6343	57.78
0.522	0.522	15.1611	62.06
0.468	0.468	17.6880	65.99
IC50	103.37 mg muestra/ml		

Figura 8. Curva de calibración para el análisis de antioxidantes del aceite esencial de tomillo obtenido por arrastre de vapor.

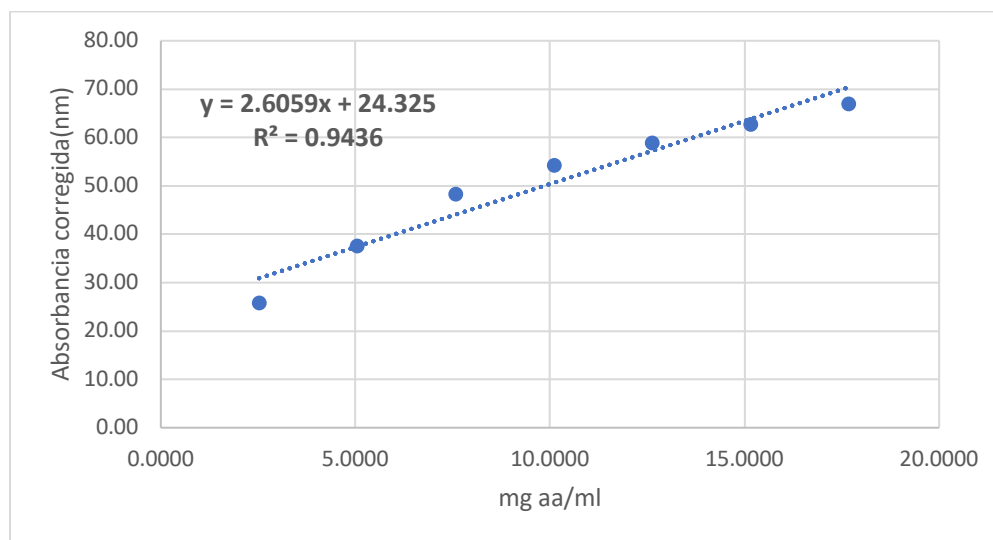


Figura 9. Curva de calibración para el duplicado análisis de antioxidantes del aceite esencial de tomillo obtenido por arrastre de vapor.

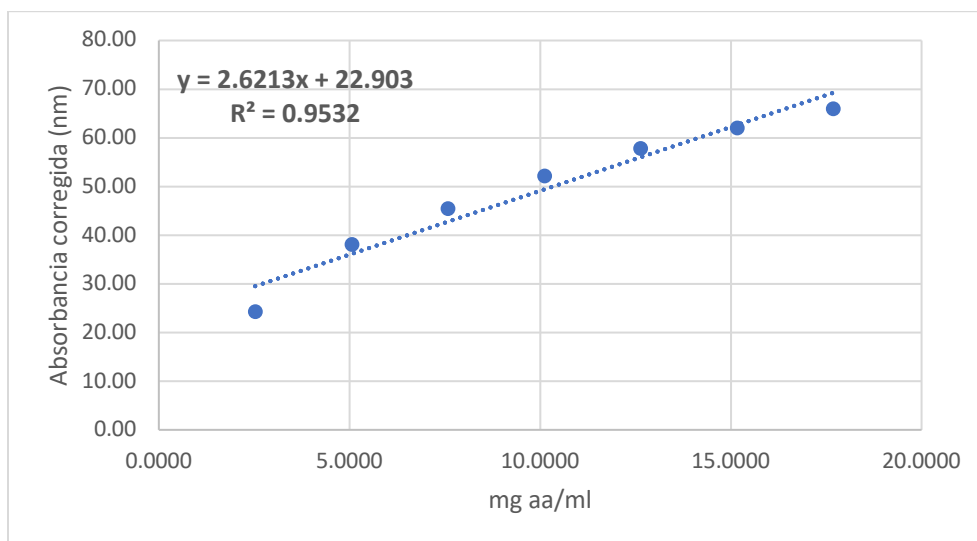


Tabla 26. Resultado para la capacidad antioxidante del aceite esencial de tomillo obtenido por arrastre de vapor con método enzimático.

Duplicado A			
Lectura 30'	Absorbancia-Blanco	mg aa/ml	% pérdida a 30'
1.193	1.193	2.5110	13.17
1.016	1.016	6.2775	26.06
0.917	0.917	10.0440	33.26
0.829	0.829	13.8105	39.67
0.768	0.768	17.5770	44.10
0.688	0.688	21.3435	49.93
0.576	0.576	25.1100	58.08
IC50	204.93 mg muestra/ml		

Tabla 27. Resultado del duplicado para la capacidad antioxidante del aceite esencial de tomillo obtenido por arrastre de vapor con método enzimático.

Duplicado B			
Lectura 30'	Absorbancia-Blanco	mg aa/ml	% pérdida a 30'
1.122	1.122	2.5110	18.34
1.01	1.010	6.2775	26.49
0.912	0.912	10.0440	33.62
0.826	0.826	13.8105	39.88
0.748	0.748	17.5770	45.56
0.687	0.687	21.3435	50.00
0.532	0.532	25.1100	61.28
IC50	198.14 mg muestra/ml		

Figura 10. Curva de calibración para el análisis de antioxidantes del aceite esencial de tomillo obtenido por arrastre de vapor con método enzimático.

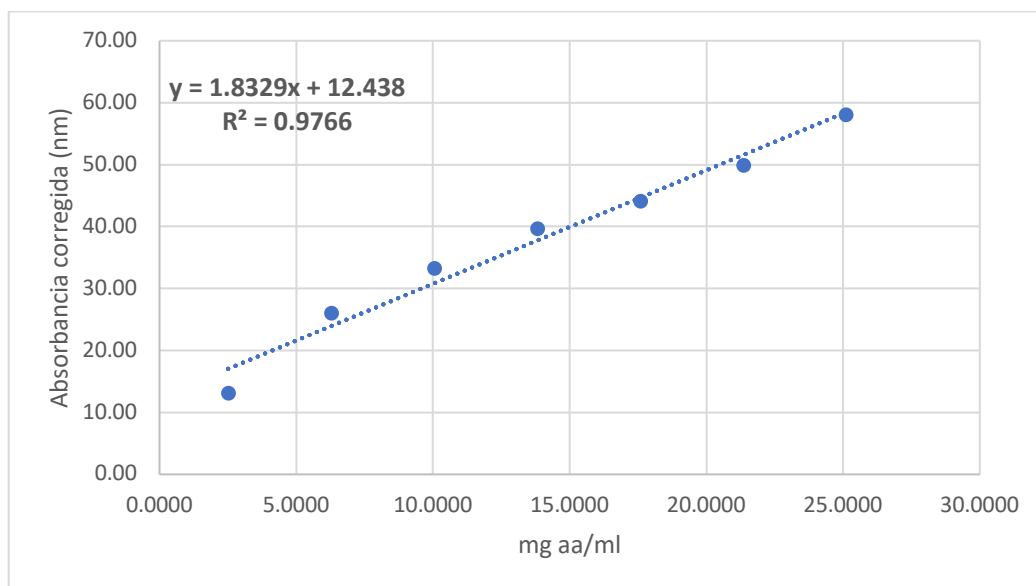


Figura 11. Curva de calibración del duplicado para el análisis de antioxidantes del aceite esencial de tomillo obtenido por arrastre de vapor con método enzimático.

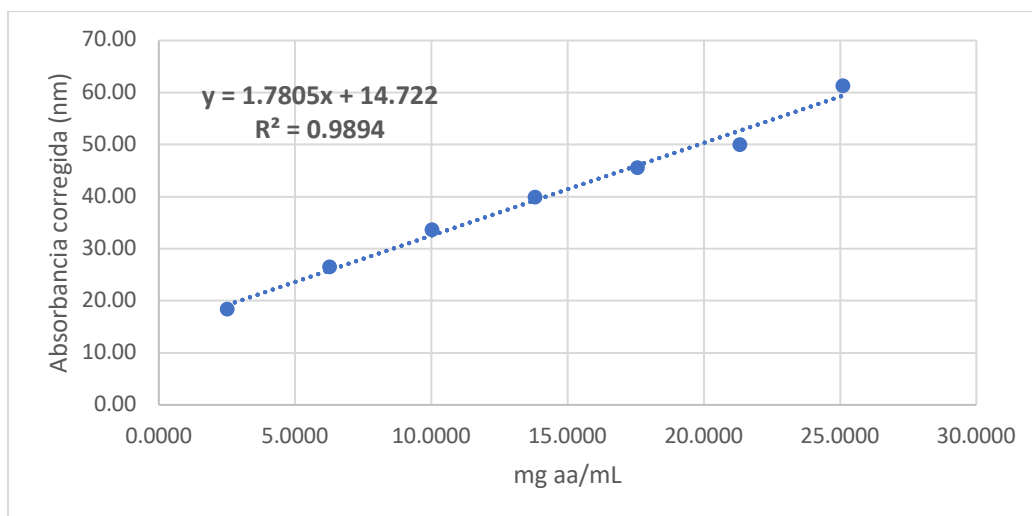


Tabla 28. Concentración de las cepas utilizadas en las placas de Elisa para la actividad antibacteriana.

	<i>Salmonella</i>	<i>E.coli</i>
Caja	Concentración en la placa (UFC/ml)	Concentración en la placa (UFC/ml)
1	4.35E+06	2.39E+05
2	4.25E+06	2.77E+05
3	5.07E+06	2.45E+05
Promedio	4.56E+06 ± 0.447	2.54E+05 ± 0.020

Tabla 29. Factores de dilución de inhibición antibacteriana para *E.coli*.

Muestra	<i>E. Coli</i>		
	FD 1	FD 2	FD 3
Aceite esencial de tomillo sin pretratamiento enzimático	1:64	1:128	1:64
Hidrolato de tomillo sin pretratamiento enzimático	1:32	1:64	1:32
Aceite esencial de tomillo con pretratamiento enzimático	1:32	1:64	1:32
Hidrolato de tomillo con pretratamiento enzimático	1:32	1:64	1:32

Tabla 30. Factores de dilución de inhibición antibacteriana para *Salmonella*.

<i>Salmonella</i>			
Muestra	FD 1	FD 2	FD 3
Aceite esencial de tomillo sin pretratamiento enzimático	1:64	1:128	1:128
Hidrolato de tomillo sin pretratamiento enzimático	1:32	1:64	1:32
Aceite esencial de tomillo con pretratamiento enzimático	1:32	1:32	1:32
Hidrolato de tomillo con pretratamiento enzimático	1:16	1:16	1:16

Tabla 31. Absorbancias a distintos factores de dilución para la inhibición antibacteriana de *Salmonella* y *E.coli* para el aceite esencial de tomillo obtenido y respectivo hidrolato.

	Absorbancias a diferentes factores de dilución												Patógeno
	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	
Aceite esencial de tomillo sin pretratamiento enzimático	0.366	0.192	0.153	0.137	0.116	0.107	0.102	0.487	0.880	0.846	0.920	1.361	<i>E.coli</i>
Hidrolato de tomillo sin pretratamiento enzimático	0.115	0.101	0.100	0.100	0.108	0.178	0.461	0.839	0.933	0.935	0.941	1.374	
Aceite esencial de tomillo con pretratamiento enzimático	0.245	0.130	0.147	0.118	0.108	0.252	0.447	0.680	0.897	0.887	0.945	1.358	
Hidrolato de tomillo con pretratamiento enzimático	0.111	0.100	0.103	0.108	0.138	0.218	0.381	0.605	0.841	0.861	0.920	1.350	
Aceite esencial de tomillo sin pretratamiento enzimático	0.353	0.233	0.192	0.153	0.138	0.130	0.123	0.324	0.395	0.906	0.958	1.530	<i>Salmonella</i>
Hidrolato de tomillo sin pretratamiento enzimático	0.108	0.099	0.100	0.103	0.116	0.149	0.383	0.588	0.807	0.926	0.964	1.550	
Aceite esencial de tomillo con pretratamiento enzimático	0.282	0.147	0.121	0.105	0.156	0.307	0.500	0.640	0.832	0.926	0.967	1.554	
Hidrolato de tomillo con pretratamiento enzimático	0.109	0.100	0.114	0.152	0.268	0.441	0.548	0.709	0.842	0.924	1.005	1.512	

Tabla 32. Resultado de la prueba T para los resultados de extracción de ambos métodos evaluados en el aceite esencial de tomillo.

<i>Parámetro</i>	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	0.296666667	0.363333333
Varianza	3.33333E-05	0.001033333
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0.000533333	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-3.535533906	
P(T<=t) una cola	0.012055055	
Valor crítico de t (una cola)	2.131846786	
P(T<=t) dos colas	0.024110111	
Valor crítico de t (dos colas)	2.776445105	

Tabla 33. Resultado de la prueba T para el índice de refracción del aceite esencial de tomillo recolectado.

<i>Parámetro</i>	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	1.4908	1.4901
Varianza	7E-08	1E-08
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	4E-08	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	4.28660705	
P(T<=t) una cola	0.006390242	
Valor crítico de t (una cola)	2.131846786	
P(T<=t) dos colas	0.012780484	
Valor crítico de t (dos colas)	2.776445105	

Tabla 34. Resultado de la prueba T para la densidad del aceite esencial de tomillo recolectado.

<i>Parámetro</i>	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	0.902833333	0.901333333
Varianza	4.09033E-05	0.000238363
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0.000139633	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	0.155468474	
P(T<=t) una cola	0.441991045	
Valor crítico de t (una cola)	2.131846786	
P(T<=t) dos colas	0.88398209	
Valor crítico de t (dos colas)	2.776445105	

Tabla 35. Resultado de la prueba T para la capacidad antioxidante del aceite esencial de tomillo recolectado.

<i>Parámetro</i>	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	100.95	201.535
Varianza	11.7128	23.05205
Observaciones	2	2
Varianza agrupada	17.382425	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	2	
Estadístico t	-24.12559529	
P(T<=t) una cola	0.000856834	
Valor crítico de t (una cola)	2.91998558	
P(T<=t) dos colas	0.001713667	
Valor crítico de t (dos colas)	4.30265273	

Figura 12. Cromatograma para el aceite esencial de tomillo obtenido por arrastre de vapor.

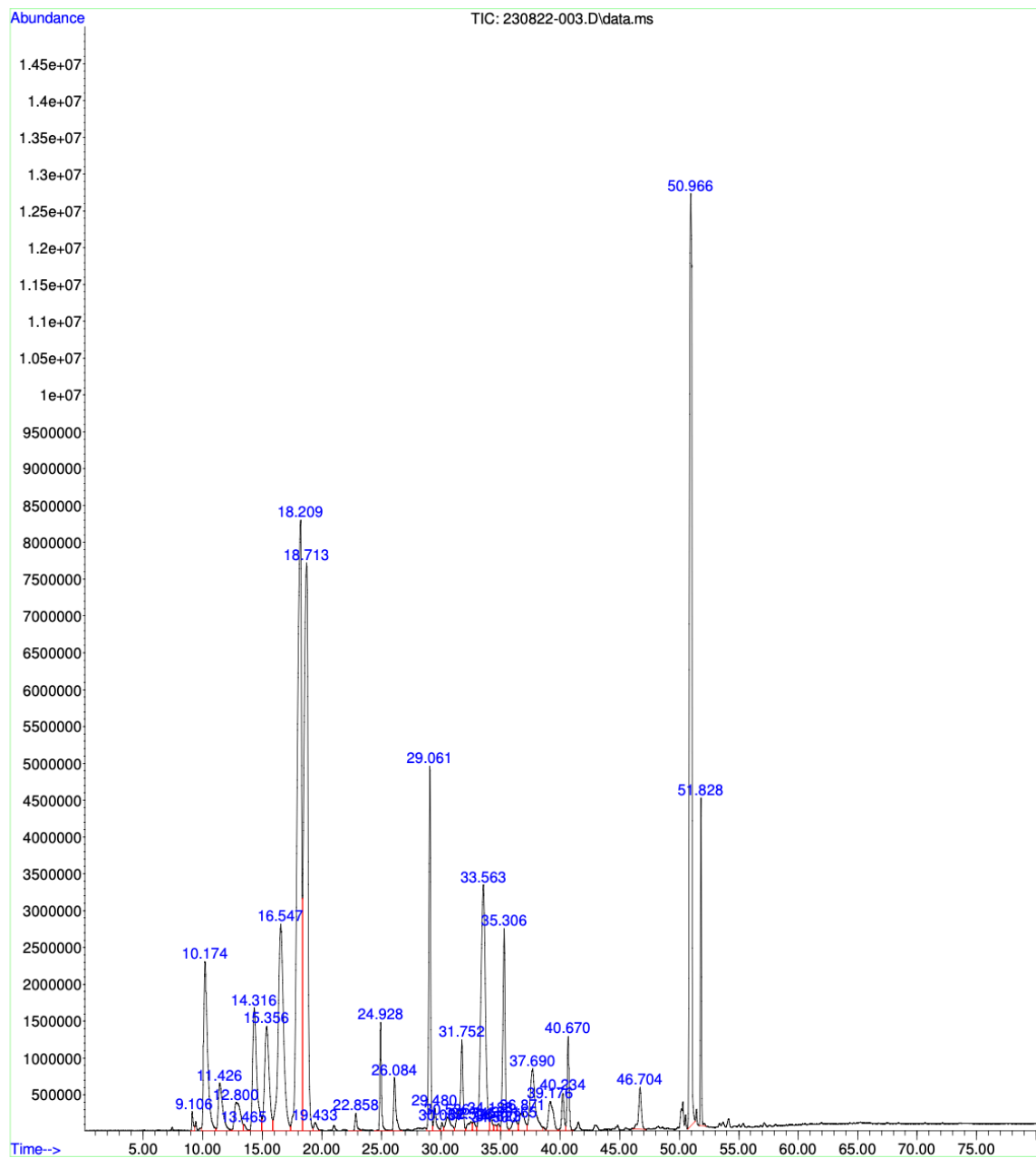


Figura 13. Cromatograma para el aceite esencial de tomillo obtenido por arrastre de vapor con método enzimático.

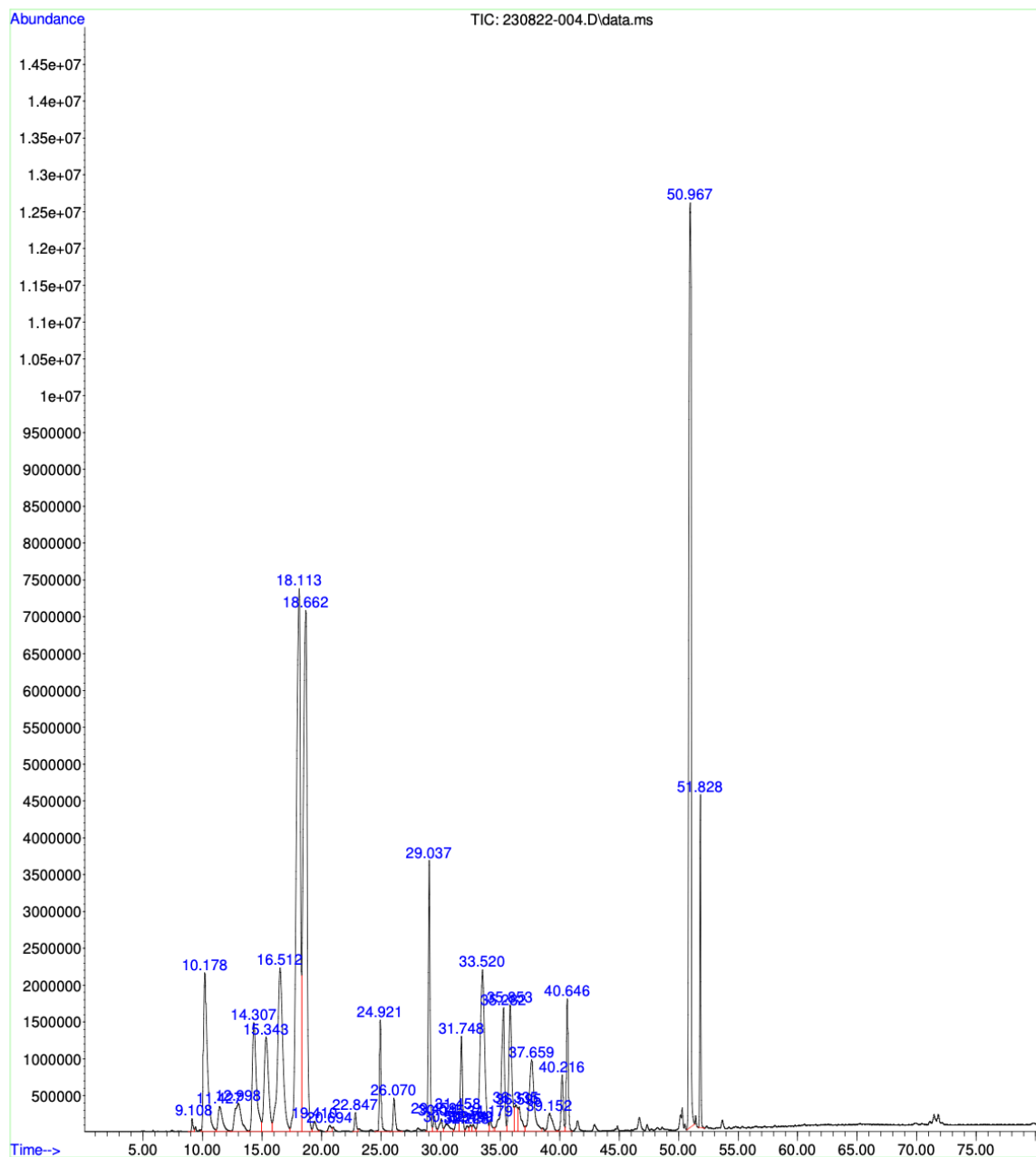


Figura 14. Cromatograma para el hidrolato de tomillo obtenido por arrastre de vapor.

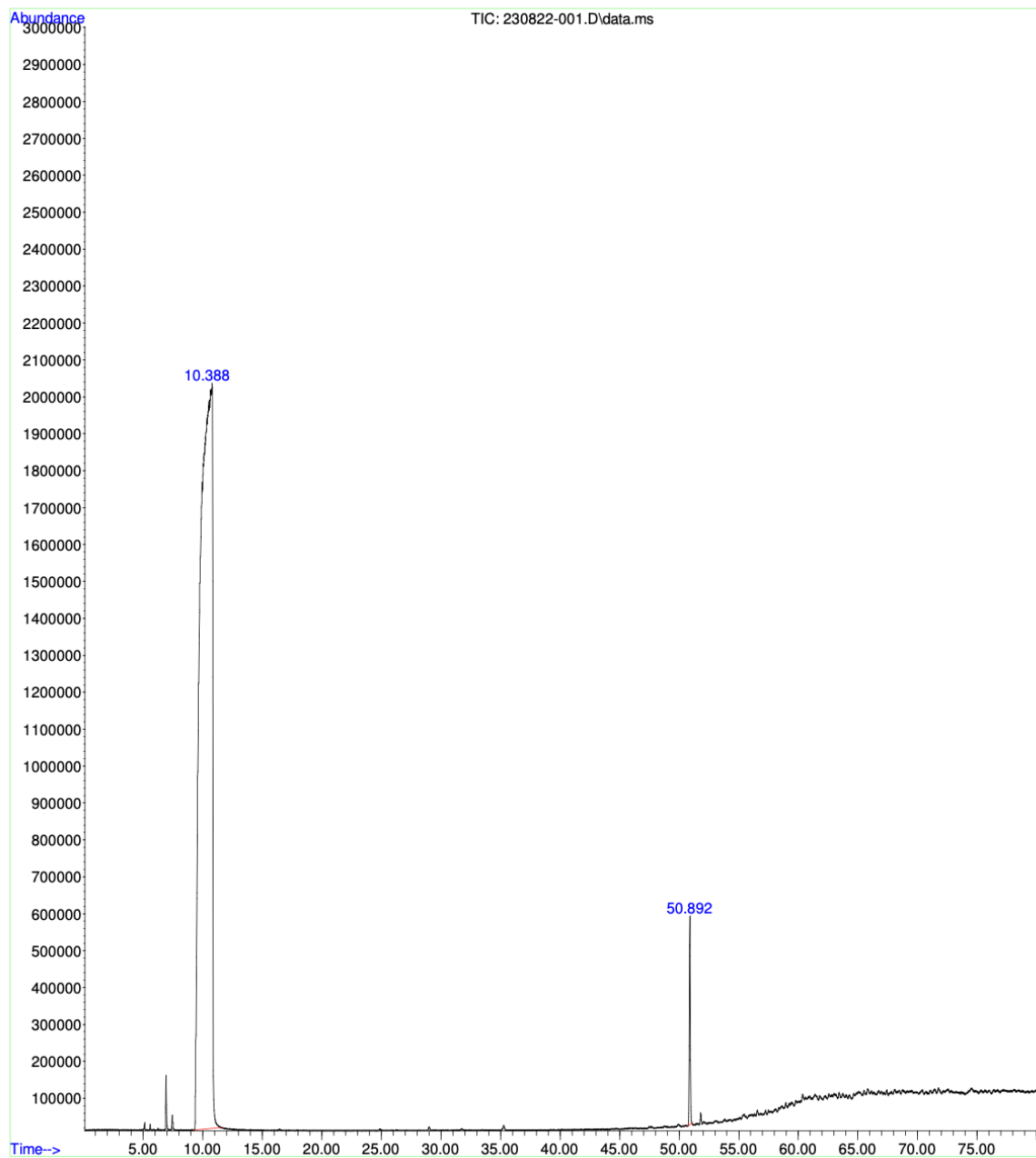


Figura 15. Cromatograma para el hidrolato de tomillo obtenido por arrastre de vapor con método enzimático.

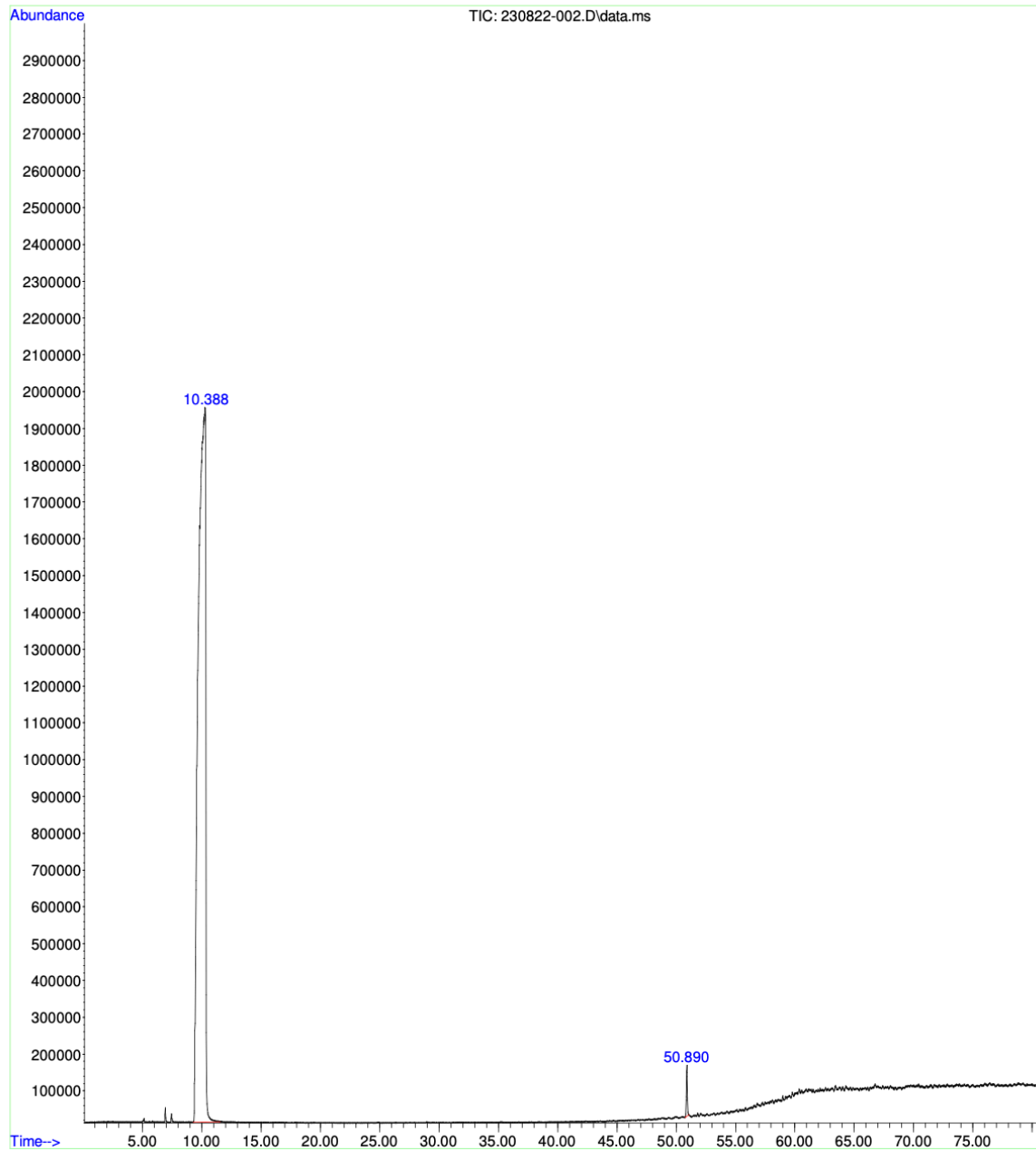


Figura 16. Extracción del aceite esencial de tomillo por arrastre de vapor.



Figura 17. Aceite esencial de tomillo recolectado.

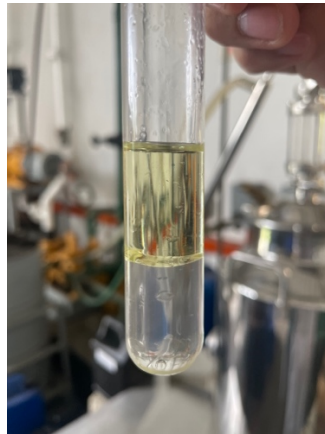


Figura 18. Enzima utilizada para la extracción del aceite esencial de tomillo.



Figura 19. Aceite esencial obtenido mediante el uso del método enzimático.



Figura 20. Determinación de la densidad del aceite esencial de tomillo.

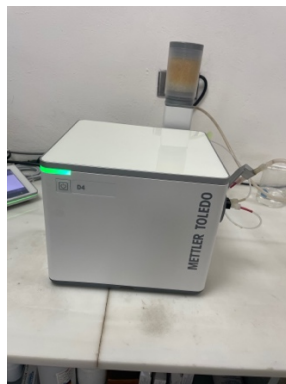


Figura 21. Análisis de antioxidantes para el aceite esencial de tomillo.

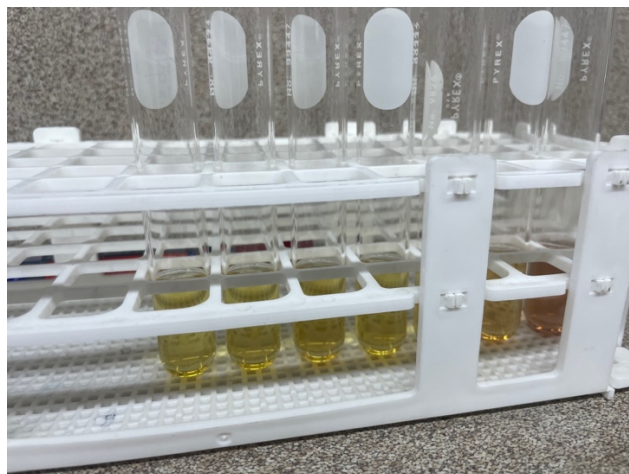


Figura 22. Recuento de colonias para la cepa *E.coli*.

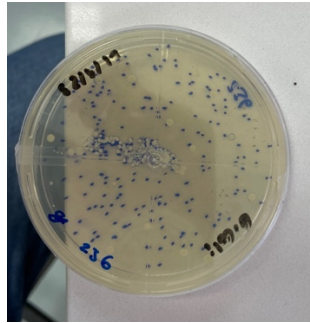


Figura 23. Recuento de colonias para la cepa *Salmonella*.

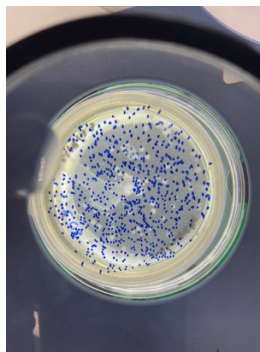


Figura 24. Análisis de inhibición antibacteriana del aceite esencial de tomillo y de respectivo hidrolato.

