

# UCUENCA

## Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Ingeniería Química

### **Evaluación de los parámetros del proceso de extracción de Timol: Un estudio comparativo de diferentes métodos de extracción**

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero Químico


#### **Autores:**

Xavier Eduardo Vélez Sarmiento

Kelly Eliana Fernández Guamán

#### **Director:**

Luisa Mayra Vera Cabezas

ORCID:  0000-0002-0240-9147

**Cuenca, Ecuador**

2023-01-05

## Resumen

El timol es un compuesto fenólico con propiedades antifúngicas y es un compuesto bioactivo presente en las hojas de la especie *Origamun Vulgare L.* El objetivo consistió en realizar la extracción de timol de las hojas de orégano frescas y secas, mediante dos técnicas de extracción: Soxhlet y arrastre de vapor. La extracción Soxhlet se llevó a cabo con diferentes concentraciones de solventes etanol-agua (100%:0%, 85%:15% y 70%:30%) con tiempos de incidencia de 6 y 12 horas; mientras que, la extracción por arrastre de vapor se realizó con un tiempo de incidencia de 1 hora. La cuantificación se llevó a cabo con espectroscopía UV-visible mediante curvas de calibración. Los resultados arrojaron que las condiciones ideales de trabajo para extraer timol con el método Soxhlet eran: concentración de solventes 70%:30%, 6 horas y 10 g de hoja fresca. Pero, se obtuvo un rendimiento máximo de 25,84% p/p con 10 g de hoja seca. Las condiciones ideales de extracción con arrastre de vapor fueron: 60 g de hoja fresca y 1 hora de extracción, con estas condiciones se obtuvo un rendimiento máximo de 0,0305% p/p. En última instancia, al comparar ambas técnicas de extracción, se concluyó que el método Soxhlet fue más eficaz para obtener un extracto más rico en timol.

*Palabras clave:* procesos de extracción, cuantificación de timol, compuesto antifúngico, extractos naturales



El contenido de este trabajo corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca, ni libera su responsabilidad ante terceros. Los autores asumen la responsabilidad de la propiedad intelectual y los derechos de autor.

**Repositorio Institucional:** <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

### Abstract

Thymol is a phenolic compound with antifungal properties and is a bioactive compound present in the leaves of the species *Origanum Vulgare* L. The aim was to extract thymol from fresh and dried oregano leaves using two extraction techniques: Soxhlet and steam extraction. Soxhlet extraction was carried out with different concentrations of ethanol-water solvents (100%:0%, 85%:15% and 70%:30%) with incidence times of 6 and 12 hours, while steam extraction was carried out with an incidence time of 1 hour. Quantification was carried out with UV-visible spectroscopy using calibration curves. The results showed that the ideal working conditions for extracting thymol with the Soxhlet method were: solvent concentration 70%:30%, 6 hours and 10 g of fresh leaf. However, a maximum yield of 25.35% w/w was obtained with 10 g of dried leaf. The ideal conditions for extraction with steam distillation were: 60 g of fresh leaf and 1 hour of extraction, with these conditions a maximum yield of 0.0305% w/w was obtained. Ultimately, when comparing both extraction techniques, it was concluded that the Soxhlet method was more efficient in obtaining an extract richer in thymol.

*Keywords: extraction processes, thymol quantification, antifungal compound, natural extracts*



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.

**Institutional Repository:** <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

## Índice de contenido

Introducción .....	12
Objetivos.....	15
Objetivo General .....	15
Objetivos específicos.....	15
Capítulo 1. Marco teórico.....	16
1.1 Aceite esencial .....	16
1.1.1 Aplicaciones de los Aceites esenciales .....	16
1.2. Métodos de Extracción .....	17
1.2.1 Extracción por arrastre de vapor .....	17
1.2.2 Extracción con solventes orgánicos (Extracción Soxhlet).....	18
1.3 Uso de solventes en la extracción de aceites esenciales.....	20
1.4 Orégano .....	21
1.4.1 Definición .....	21
1.4.2 Usos .....	21
1.4.3 Composición química del orégano .....	22
1.4.4 Actividad biológica de los componentes del orégano .....	24
1.5 Timol .....	25
1.5.1 Propiedades antimicrobianas .....	26
1.5.2 Propiedades antioxidantes .....	27
1.5.3 Propiedades antiinflamatorias .....	27
1.6 Espectroscopia UV-visible .....	27
Capítulo 2. Metodología.....	29
2.1 Materia prima .....	29
2.1.1 Origanum Vulgare L. ....	29
2.1.2 Etanol potable .....	30
2.2 Acondicionamiento de la muestra fresca .....	30

2.2.3 Diagrama de bloques de la preparación de muestra fresca.....	31
2.3 Acondicionamiento de la muestra seca .....	31
2.3.1 Materiales y equipos .....	32
2.3.2 Procedimiento .....	32
2.3.3 Diagrama de bloques para la preparación de muestra seca.....	33
2.4 Métodos de extracción .....	34
2.4.1 Método Soxhlet .....	34
2.4.2 Extracción por arrastre de vapor .....	35
2.5 Curvas de calibración .....	36
2.5.1 Materiales, equipos y reactivos .....	37
2.5.2 Procedimiento para la elaboración de las de curvas de calibración.....	37
2.6 Cuantificación del timol y cálculos para el rendimiento .....	38
2.6.1 Materiales, equipos y reactivos .....	38
2.6.2 Procedimiento para la cuantificación de timol.....	38
2.6.3 Cálculo de la concentración real del extracto de timol.....	39
2.6.4 Cálculo del rendimiento de la muestra .....	39
2.7 Análisis estadístico inferencial .....	40
2.7.1 Pruebas de normalidad .....	40
2.7.2 Análisis estadístico para la extracción con el método Soxhlet.....	41
2.7.3 Análisis estadístico para la extracción por arrastre de vapor.....	43
Capítulo 3. Resultados.....	45
3.1 Resultados de las curvas de calibración.....	45
3.2 Resultados de las extracciones Soxhlet y arrastre de vapor .....	48
3.3 Resultados del análisis estadístico inferencial .....	53
3.3.1 Resultados de las pruebas de normalidad .....	53
3.3.2 Resultados del análisis estadístico inferencial para la extracción Soxhlet .....	53
3.3.3 Resultados del análisis estadístico inferencial para la extracción con arrastre de vapor.....	58
Capítulo 4. Discusión .....	61

# UCUENCA

6

Capítulo 5. Conclusiones ..... 69

Recomendaciones ..... 70

Referencias..... 71

Anexos..... 85

**Índice de figuras**

Figura 1. Estructura química del timol.....	25
Figura 2. Diagrama de bloques de la preparación de muestra fresca.....	31
Figura 3. Diagrama de bloques para la preparación de la muestra seca.....	33
Figura 4. Espectro de absorción del timol obtenido para la concentración 100% etanol.....	47
Figura 5. Curva de calibración 100% etanol.....	48
Figura 6. Diagrama de barras de concentraciones de solventes con respecto al rendimiento .....	56
Figura 7. Diagrama de barras del tiempo con respecto al rendimiento de extracto de timol .	57
Figura 8. Diagrama de barras del tipo de muestra con respecto al rendimiento.....	58
Figura 9. Diagrama de barras del tipo de muestra con respecto al rendimiento usados para el arrastre de vapor.....	60

**Índice de tablas**

Tabla 1. Cuadro comparativo de los métodos de extracción Soxhlet y arrastre de vapor.....	20
Tabla 2. Componentes principales en 100 g de orégano seco.....	24
Tabla 3. Porcentaje de timol en diferentes épocas del año.....	26
Tabla 4. Materiales y reactivos para la preparación de muestra fresca.....	30
Tabla 5. Materiales y reactivos para la preparación de muestra seca.....	32
Tabla 6. Materiales y reactivos para la extracción por método Soxhlet.....	34
Tabla 7. Materiales y reactivos para la extracción con arrastre de vapor.....	35
Tabla 8. Materiales y reactivos para la elaboración de las curvas de calibración.....	37
Tabla 9. Materiales y reactivos para la cuantificación de timol.....	38
Tabla 10. Coeficientes de correlación, ecuaciones de las curvas de calibración y longitud de onda máxima.....	46
Tabla 11. Concentraciones en ppm obtenidas en el espectrofotómetro para la extracción con el método Soxhlet.....	49
Tabla 12. Concentraciones reales en ppm calculadas para la extracción con el método Soxhlet.....	50
Tabla 13. Concentraciones reales en ppm obtenidas en el espectrofotómetro para la extracción con arrastre de vapor.....	51
Tabla 14. Rendimiento de timol en %p/p obtenidos a partir de la extracción con el método Soxhlet.....	52
Tabla 15. Rendimiento de timol en %p/p obtenido con el método de arrastre de vapor.....	52
Tabla 16. Resultados de las pruebas de normalidad con Shapiro-Wilks.....	53
Tabla 17. Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis aplicada a la extracción Soxhlet.....	54
Tabla 18. Resultados de la prueba U de Mann-Whitney por parejas de concentraciones de solventes usados para la extracción con el método Soxhlet.....	55
Tabla 19. Resultado de la prueba de Levene para varianzas iguales.....	59
Tabla 20. Resultados de la prueba de t de Welch para los rendimientos obtenidos con el arrastre de vapor.....	59



## Dedicatoria

En primera instancia quiero dedicar este trabajo a mis padres Manuel y Narcisa, que sin su apoyo no hubiera llegado a este momento de mi vida, dado que ellos siempre me brindaron su confianza y siempre creyeron en mí. A mis padres les quiero decir que muchas gracias, por enseñarme a no rendirme y a seguir adelante, que todo consejo que me brindaron siempre lo guarde en mi corazón y lo intente poner en marcha.

A mi abuela Celina, que siempre sentí que me acompañó en todo el proceso, a mi hermana y a mis 5 queridos perrunos que siempre están conmigo.

A mis amigos, Juan, Kevin, Cami, Gabs, Evelyn y Carlos que siempre me alentaron para todo, que nunca me dejaron rendirme y que siempre estuvieron para escucharme del mismo tema uno y otra vez.

A mi amiga Kells, mi compañera de tesis, mi confidente, mi mejor amiga, por acompañarme en lo largo de este trabajo de titulación, que sin ella no lo hubiera podido concluir, siempre me estuvo apoyando y aconsejando en lo que fuera. Gracias Kellsilla.

Y por último y no menos importante, me quiero agradecer a mí mismo por haber puesto el esfuerzo necesario para la conclusión de este trabajo, así que gracias Xavier del pasado por ayudarme a terminar el trabajo, ahora el Xavier del presente está redactando esto y posiblemente el Xavier del futuro ya este festejando el título.

### Dedicatoria

A mi todo, a mi mamá Narcisa, a quien admiro tanto que me resulta complicado expresar en simples palabras lo agradecida que estoy con ella. Era nuestro sueño obtener este título universitario, y a pesar de la distancia que nos separa, nada me complace más que decirle que al fin lo logramos. Todo esto sería imposible sin el amor desmesurado que me brinda cada día, sin sus besos o sin sus frases de amor. Le quiero agradecer por alentarme en los malos momentos, por secar mis lágrimas, abrazarme y recordarme que todo va a estar bien. Perdón por ser un pollito dramático y olvidar que no hay nada que a su lado no pueda lograr, que no hay nada que a su lado no tenga solución. Siempre vivirán en mis sus palabras, que suerte saber que ya es eterna.

A mi papá, Guillermo, a quien amo y agradezco por brindarme siempre su apoyo durante cada paso de mi vida, valoro mucho su sacrificio y todo lo que ha hecho por mí. Gracias por los consejos y todas las enseñanzas, este logro no sería posible sin su amor y sin los helados que compartimos todos los días que pasaba por mí a la escuela. Siempre seré la niña de sus ojos.

A mi hermano Kevin, siempre te recuerdo en el cielo celeste y despejado, aunque cuando quiero sentirte cerca escucho las canciones que tanto te gustaban. Donde sea que estés, comparto este y futuros logros contigo. Viviré y disfrutaré todo lo que tú ya no pudiste.

A mi amado Zack, gracias por tu compañía. Tus ronquidos de madrugada, el sonido de tus patitas en el piso y tus ojos amorosos, hicieron las tardes de estudio y las noches de insomnio menos tediosas. Nuestros innumerables paseos están grabados en mi corazón y tu sola existencia será siempre suficiente para darme paz. Abrazarte será siempre el alivio de mi alma.

Por último, un agradecimiento profundo por todos estos maravillosos años a mis amigos y futuros colegas: Alex, Isaac, Gabriela, Rubén, Antonio, Xavier, Edwin, Evelyn, Michael y Carlos; con quienes compartí momentos que sanaron mi corazón y marcaron mi alma.

## Agradecimiento

Queremos expresar nuestro más sincero agradecimiento a todas las personas que colaboraron en la elaboración de este trabajo de titulación, su apoyo fue fundamental e indispensable para el éxito de esta investigación.

En primer lugar, queremos agradecer a nuestra tutora, PhD. Mayra Vera, y a nuestra asesora, Mgt. Ana Astudillo, quienes siempre nos guiaron y brindaron una retroalimentación sustancial para el progreso de este trabajo. El compromiso y conocimientos de estas grandes profesionales han sido de gran valor para nuestra formación académica.

De igual forma, queremos agradecer al Centro de Estudios Ambientales (CEA), que prestó sus instalaciones para desarrollar este trabajo, en especial queremos agradecer a la Ing. Diana Brazales, quien se convirtió en una gran amiga y maestra, que siempre estuvo al pendiente de nosotros y de este trabajo, su gran humanidad, compromiso y disposición para brindarnos ayuda en diferentes aspectos de nuestra investigación han sido invaluable. Dianita le estaremos eternamente agradecidos.

Un agradecimiento final a todos aquellos que de alguna u otra forma aportaron en la realización de esta tesis.

## Introducción

La extracción de compuestos bioactivos de matrices vegetales es un campo de interés que ha estado en constante crecimiento para las industrias químicas como las farmacéuticas, debido a sus potenciales beneficios en la salud y en las aplicaciones industriales. Un compuesto de notable relevancia es el timol, el cual pertenece a la categoría de los fenoles monoterpénicos, que ha demostrado poseer propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antiinflamatorias. Este compuesto se encuentra presente en diferentes plantas de la familia *Origanum*, comúnmente llamado orégano, y es una planta ampliamente utilizada en la gastronomía y la medicina local.

Por otro lado, la agricultura es una actividad fundamental para la humanidad, ya que proporciona alimentos, fibras y otros productos esenciales. No obstante, los cultivos se enfrentan a una problemática como la pérdida del rendimiento y calidad e incluso su pérdida total, a causa de una serie de amenazas como: plagas, enfermedades y condiciones climáticas adversas. Por esa razón se emplean compuestos con propiedades fúngicas, puesto que pueden inhibir el crecimiento de los hongos en los cultivos (FAO, 2022).

Teniendo en cuenta que, el orégano es una hierba aromática que posee una gran adaptación a diferentes tipos de suelo, cuenta con una amplia variedad de especies, que varían de acuerdo a su región (Suárez, 2013). Uno de sus compuestos bioactivos presente es el timol, este es un compuesto fenólico natural, el cual otorga propiedades antimicrobianas, antisépticas, antioxidantes e insecticidas (Xu et al., 2023).

El timol, en comparación con los fungicidas sintéticos es una alternativa segura debido a su eficacia, seguridad y sostenibilidad para el tratamiento de las enfermedades fúngicas. El timol a diferencia de los fungicidas químicos sintéticos, es de origen natural convirtiéndolo en una sustancia química "generalmente reconocida como segura" (GRAS), por lo tanto, se puede considerar como una alternativa de los fungicidas sintéticos tradicionales, dado que, es una opción más amigable con la agricultura y el medio ambiente (Ranjbar et al., 2022). Asimismo, el timol cuenta con múltiples mecanismos de acción, como alterar la pared celular o membrana, interferir con la biosíntesis de ergosterol e inducir especies reactivas de oxígeno y peroxidación lipídica en células fúngicas (Shcherbakova et al., 2021).

El uso de solventes orgánicos en diversas industrias y procesos es indispensable, porque pueden disolver, mezclar o extraer compuestos orgánicos. La importancia que tienen en campos que van desde la química y la farmacéutica hasta la pintura y la producción de alimentos, hacen que sea relevante el conocer su comportamiento con el fin de hacer una

selección acorde a la acción a realizarse. Actualmente debido a las regulaciones que se han ido implementado a lo largo de los años se deben considerar propiedades como, por ejemplo: el poder del solvente o la volatilidad, factores que pueden llegar a perjudicar la salud de las personas y al medio ambiente (Joshi & Adhikari, 2019).

Los solventes orgánicos más comunes se clasifican en: hidrocarburos alifáticos, aromáticos, cíclicos y halogenados, aminas, cetonas, ésteres, aldehídos, alcoholes, etc. Como su estructura molecular está principalmente compuesta por carbono, hidrógeno y heteroátomos que pueden llegar a ser volátiles y lipofílicos. Además, al ser altamente volátiles provoca que lleguen al aire con facilidad y a su vez a los pulmones debido a la inhalación. El conocer el riesgo asociado con los solventes orgánicos ha llevado a buscar nuevas y mejores opciones que reduzcan o eviten el uso de solventes orgánicos. La química verde se está enfocando en desarrollar productos con una toxicidad mínima, disminuir el uso y su reutilización (Marchetti et al., 2014). Reutilizar el solvente no solo evita que se deseche y genere más contaminación ambiental, sino que también ayuda a reducir los costos de producción. Marchetti et al. (2014) mencionan que para la industria química y farmacéutica los costos operativos y del capital están sujetos a los procesos de separación, representando entre el 40 y el 70% de éstos; por lo que reemplazar, rehusar o reducir el uso de solventes orgánicos facilita la economía de la industria y la hace más barata y accesible para el comprador.

La mezcla de solventes etanol-agua destilada presenta grandes ventajas sobre algunos compuestos tradicionales como el diclorometano, cloroformo, hexano, etc. Las principales ventajas de la mezcla son su biodegradabilidad y su no toxicidad, al contrario de los solventes tradicionales que son tóxicos y contaminan el medio ambiente (Akter et. al., 2022). La mezcla etanol y agua es más eficiente que los solventes tradicionales debido a que estos últimos suelen ser difíciles de eliminar del producto final. En cambio, la mezcla etanol y agua puede ser eliminada por evaporación, estos aspectos hacen que sea más sostenible y segura para la extracción de timol. Por esa razón, esta mezcla puede ayudar a reducir la contaminación del medio ambiente, también es favorable en la parte económica, puesto que, es menos costoso el etanol y el agua con respecto a los solventes tradicionales (Sanchez et. al., 2016; Al-Olayan et al., 2022).

Por lo anterior mencionado, se considera de gran importancia la realización de este trabajo de titulación, debido a que, propone estudiar el comportamiento de la mezcla agua y etanol como solvente para la obtención de un extracto de timol, utilizando los métodos de extracción: Soxhlet y arrastre de vapor, que contribuirán con la búsqueda de la reducción del uso de solventes orgánicos; además, de que determinará las mejores condiciones de extracción

(concentración de solventes, tiempo de extracción y tipo de muestra). Es necesario mencionar que, el presente trabajo se desarrolló dentro del proyecto ganador *Fungicidas para la utilización en agricultura orgánica a base de nanopartículas de metales/extracto de plantas/biopolímeros. Caracterización estructural y evaluación de su acción biocida* (FIASA), mismo que está encargado de identificar el proceso más viable para la extracción del timol y su posterior uso como agente fungicida.

## Objetivos

### Objetivo General

Optimizar la concentración de solventes y el tratamiento adecuado de muestras de orégano, para la extracción del timol, mediante dos técnicas de extracción.

### Objetivos específicos

- Preparar y acondicionar las muestras de orégano para la obtención del extracto.
- Elaboración de curvas de calibración y cuantificación del timol.
- Determinar las mejores condiciones para la extracción.

## Capítulo 1. Marco teórico

### 1.1 Aceite esencial

Según Aparicio (2021) denomina a los aceites esenciales (AE) como mezclas complejas de compuestos orgánicos volátiles, que son los responsables del aroma y sabor características de las plantas, en general son fracciones líquidas muy volátiles que están conformado por más de 100 compuestos los cuales pueden ser: compuestos alifáticos de bajo peso molecular, monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos. Además, se caracterizan por ser insolubles en agua, pero solubles en alcohol, éter y aceites vegetales (Cairo, 2009).

Pino, J. (2015) define a los aceites esenciales como *“Un producto oloroso, usualmente de composición compleja, obtenido de un material de una planta definida botánicamente, mediante destilación con vapor, destilación seca o por algún proceso mecánico”*

Los aceites esenciales se pueden extraer de distintas partes de la planta como: de las semillas, raíces, flores, cortezas y cáscaras de las frutas mediante procesos de destilación o mecánicos (Requejo, 2020). Por esa razón, antes de obtener el AE, es importante investigar que parte de la planta es la más óptima, en el caso del orégano se recomienda las hojas. No obstante, un problema de los aceites esenciales consiste en que, para su extracción se emplea una gran cantidad de material vegetal, por consiguiente, tienen un elevado costo (Vera & Zambrano, 2017).

Factores como el entorno, el origen de la planta y el método de extracción pueden influir en la composición química de los aceites esenciales. El valor económico y el potencial industrial de los aceites esenciales están directamente vinculados a su estructura química y sus efectos biológicos (Acevedo et al., 2013).

#### 1.1.1 Aplicaciones de los Aceites esenciales

La composición química de los aceites esenciales permite tener varios usos, por ejemplo, en la farmacología e industria alimentaria se destaca como aromatizante y saborizante, se emplea de manera amplia en perfumes y productos de limpieza (López, 2004). También, cumplen la función de proteger los cultivos contra las plagas y como repelente de insectos, dado que, no se acumulan en el medio ambiente provocando la disminución del riesgo del desarrollo de cepas patogénicas resistentes (Pino, 2015).



## 1.2. Métodos de Extracción

Los aceites esenciales son extractos líquidos de plantas obtenidos por el contacto con disolventes. Los aceites esenciales se componen de sustancias biológicas y son productos vegetales aromáticos que se almacenan en glándulas especiales, raíces y hojas. Existe varios métodos para extraer aceites esenciales como: extracción por arrastre de vapor, la extracción con disolventes, la extracción con CO<sub>2</sub>, la maceración, el enfleurage y la extracción con prensa en frío (Aziz et al., 2018; Tongnuanchan & Benjakul, 2014).

La elección del adecuado método de extracción va a depender de los compuestos específicos que se desee extraer, el procedimiento de extracción condiciona el uso del AE, por ejemplo, los solventes empleados pueden contaminar o limitar su uso. Por otra parte, la extracción de un aceite esencial inicia desde la preparación de la materia prima, partiendo de su cosecha para aquello, es necesario establecer con anterioridad que parte de la planta se requiere para la extracción de acuerdo a cada especie, posteriormente antes de aplicar el método de extracción, se procede a limpiar, triturar y en algunos casos se remoja y se efectúa el secado (Novoa, 2019).

A continuación, se detallan los métodos de extracción empleados en esta investigación.

### 1.2.1 Extracción por arrastre de vapor

La extracción por arrastre de vapor es el método más antiguo y más usado industrialmente para obtener el AE de diferentes tipos de planta, dado que es capaz de separar sustancias insolubles en agua y ligeramente volátiles, de otras no volátiles que se encuentran en la mezcla. Esta metodología de destilación resulta altamente beneficiosa para sustancias con puntos de ebullición significativamente superiores a los 100 °C y que tienden a descomponerse antes o al alcanzar la temperatura correspondiente a su punto de ebullición (Sánchez, 2009).

Su fundamento se basa en una mezcla de dos líquidos inmiscibles, como el agua y el alcohol, las presiones de vapor de cada componente se suman para dar la presión de vapor total. La temperatura a la cual la presión de vapor total es igual a la presión atmosférica se llama temperatura de ebullición de la mezcla (Inmaculada Angurell et al., 2016).

El procedimiento de este método consiste en que, la materia prima a destilar y el agua para la producción de vapor no se colocan en un mismo recipiente, es decir, no se encuentran en contacto directo, dado que, el vapor de agua requerido es producido externamente e inyectado en el matraz donde se encuentra la materia a destilar, por medio de un tubo que

llega hasta el fondo del mismo, de esta forma, el vapor se distribuye uniformemente a través de la materia prima, arrastrando los aceites esenciales que posteriormente son condensados y aislados (Casado, 2018). En la Figura 1, se observa el equipo de arrastre de vapor.

### 1.2.2 Extracción con solventes orgánicos (Extracción Soxhlet)

En 1879 Franz Von Soxhlet desarrolló un método para la extracción de compuestos orgánicos. Esta técnica usa un equipo denominado extractor Soxhlet, cuyo principio se basa en el contacto de un sustrato en fase sólida con un solvente en fase líquida, mediante evaporación continua, logra la extracción de ciertos componentes del sustrato, es decir que al calentar el solvente este evapora y se condensa múltiples veces y al estar en contacto directo constantemente con la muestra se logran extraer sus compuestos orgánicos, estos normalmente suelen ser lípidos (Uribe, 2022). Por ende, el equipo Soxhlet se encarga de recircular los vapores condensados con ayuda de un sifón a la fuente de disolvente que está en evaporación continua, arrastrando con ello los principios activos de la materia prima contenido en los cartuchos desechables (Caldas, 2012).

Este método presenta la ventaja de operar en rangos de temperatura reducidos, evitando así el riesgo de degradación térmica o cambios químicos en los constituyentes del aceite (Angulo et al., 2012).

La elección del solvente tiene como objetivo identificar aquel que pueda disolver de manera rápida todos los componentes activos con una mínima presencia de sustancias inactivas. Además, se busca que tenga un punto de ebullición bajo y constante, permitiendo su eliminación eficiente sin incurrir en pérdidas debido a la evaporación. Es esencial que el solvente sea químicamente neutro para no reaccionar con los constituyentes de los aceites, además de ser no inflamable y económico. Algunos de los solventes más ocupados son alcohol, benceno, hexano, éter de petróleo, etc. (Villamizar & Aular, 2022).

El propósito de utilizar etanol en la extracción Soxhlet es disolver y extraer una amplia gama de compuestos de la muestra. El etanol es una buena opción de solvente para la extracción Soxhlet porque tiene un alto punto de ebullición y es capaz de disolver una variedad de compuestos (Patel & Shah, 2015; Redfern et al., 2014). Además, el etanol está clasificado como seguro para su uso en aplicaciones alimentarias, farmacéuticas y cosméticas. Por tanto, es un disolvente seguro y eficaz para extraer compuestos del material vegetal (Patel & Shah, 2015).

Por otra parte, el agua como solvente dependerá del compuesto que se extrae y de su solubilidad en la misma. Sin embargo, el agua se considera un solvente ecológico y tiene varias ventajas sobre otros solventes, dado que, no es tóxico lo cual le convierte en una opción segura en comparación con otros disolventes ya que no es perjudicial para la salud humana, otra característica relevante es su fácil disponibilidad y al mismo tiempo económico, asimismo, posee una alta eficiencia de extracción gracias a la extracción dinámica y al reflujo continuo del disolvente (Hawthorne et al., 2000). Sin embargo, la eficacia del agua en comparación con otros disolventes depende de la solubilidad del compuesto que se extrae. Para compuestos que son más solubles en otros solventes, como solventes orgánicos, la extracción Soxhlet usando esos solventes puede ser más efectiva (Kumar et al., 2018).

Al mezclar dos solventes, como el agua y etanol puede lograr varias ventajas, entre ellas:

- Eficiencia de extracción: la mezcla de agua y etanol son disolventes eficaces para la extracción de compuestos fenólicos de las plantas, que tienen propiedades antioxidantes (Plaskova & Mlcek, 2023; Waszkowiak & Gliszczyńska-Świgło, 2015).
- Las moléculas de timol no se disuelven fácilmente en agua porque el grupo metilo es hidrofóbico. El grupo metilo es un grupo funcional que repele el agua. (González-Torres et al., 2020).

En la Tabla 1 se muestran las ventajas y desventajas de los métodos de extracción.

Tabla 1. Cuadro comparativo de los métodos de extracción Soxhlet y arrastre de vapor

Método de extracción	Ventaja	Desventaja
Extracción con arrastre de vapor	-Uso tanto a escala industrial como de laboratorio	-Se produce polimerización y resinificación de los terpenos
	-Buen rendimiento en aceite extraído	-Se produce hidrólisis de los ésteres
Extracción con solventes (Soxhlet)	-Aceite libre de solventes	-Destrucción térmica de algunos compuestos
	-Bajo costo	-Posibilidad de que existan impurezas o residuos de los solventes utilizados
	-Uso de temperaturas no muy elevadas (60 a 90°C)	-Elevados costos
	-No destruye ni provoca alteración química en el AE	-Contaminante del medio ambiente
	-Potencial de segregación de elementos individuales.	-Complicaciones para separar el solvente del AE

Fuente: (Esquivel & Vargas, 2007), (Contreras et al., 2022) y (Villamizar & Aular, 2022)

### 1.3 Uso de solventes en la extracción de aceites esenciales

La extracción de aceites esenciales utilizando solventes es un método común, pero no es el más ecológico. Los solventes empleados pueden ser derivados del petróleo, como el hexano y el pentano, o solventes halogenados. Además, la extracción con solventes puede dejar residuos químicos en el aceite esencial (Cavallaro et al., 2023). A continuación, se exponen algunos ejemplos de disolventes que son eficaces para extraer aceites esenciales:

- Hexano y pentano: son muy comunes para extraer aceites esenciales de pimientos, canela, romero, salvia, albahaca y otras plantas que contienen una cantidad mínima

de aceite esencial. No obstante, pueden ser tóxicos y peligrosos, económicamente no son beneficiosos debido a su costo (Samadi et al., 2020).

- Etanol de alto grado de pureza: es un disolvente usado en plantas que pueden contener un alto contenido de aceite esencial, como clavo de olor, nuez moscada y jengibre. A pesar de ser seguro para el consumo humano, es poco eficiente porque extrae compuestos químicos no aromáticos, esto puede modificar la naturaleza del aceite esencial y por tanto alterar sus propiedades (Rodríguez et al., 2012).
- Acetona: usado para extraer aceites esenciales de plantas con bajo contenido de dicha sustancia, como el tomillo y el orégano. Al igual que el etanol es capaz de extraer compuestos no aromáticos, por lo tanto, podría alterar el aceite esencial (Rodríguez et al., 2012).
- Dióxido de carbono supercrítico: es un disolvente orgánico que se utiliza para extraer aceites aromáticos de las plantas. Es usado en plantas cuyos aceites esenciales son delicados como: la rosa, el jazmín y el cilantro (Aziz et al., 2018).
- Agua: generalmente se usa calor para producir el vapor de agua con el que se efectúa la extracción. Los métodos que usan agua son los más ecológicos y producen aceites de alta calidad debido a que el agua no deja residuos que sean tóxicos o puedan comprometer la composición del aceite esencial (Cavallaro et al., 2023).

## 1.4 Orégano

### 1.4.1 Definición

El orégano es proveniente de Europa y adaptado en medio oeste (Fukalova et al., 2021), está distribuido en todo el mundo especialmente en regiones con una temperatura templada. El orégano (*origanum vulgare*) forma parte de la familia Lamiaceae, que produce flores desde colores púrpuras a blancos (Laurlund, 2021).

En Ecuador se produce en la gran mayoría de sus regiones. El contenido de los compuestos de la hoja de orégano puede variar por diferentes factores como la especie, clima, altitud y estado de recolección de la planta (Villavicencio Gastelú, 2017).

### 1.4.2 Usos

El orégano se caracteriza por ser una planta aromática otorgándole un valor comercial por sus usos como especia, condimento y propiedades medicinales (Arcila et al., 2012).

El orégano se destaca principalmente por su empleo como aceite esencial, este es usado para otorgar fragancia en jabones, perfumes y cosméticos, también cumple la función como saborizante, siendo utilizado en la industria alimentaria. Es necesario recalcar, que posee propiedades antifúngicas, antiparasitarias, antimicrobianas y antioxidantes (García et al., 2012).

Según un estudio realizado por Zambrano-Intriago et al., (2015) en la parroquia San Carlos, en Quevedo, las plantas con fines medicinales implican la elaboración de infusiones utilizando agua o alcohol, mientras que en menor medida se realiza mediante trituración, emplastos, incorporación en jugos de frutas y maceración. La modalidad predominante de aplicación es a través de la ingestión, lo que demuestra que los residentes de la región optan mayormente por la vía oral debido a su capacidad de favorecer una absorción más veloz de los atributos medicinales de las plantas empleadas.

#### 1.4.3 Composición química del orégano

Se han realizado varios estudios sobre la composición química del orégano, empleando tanto extractos acuosos como sus aceites esenciales. En los cuales se han encontrado flavonoides: apigenina, luteolina, agliconas, acoholes alifáticos, compuestos terpénicos y derivados del fenilpropano. Por lo que la composición del orégano puede variar de acuerdo a su naturaleza y se clasifica en tres categorías: compuestos volátiles, lípidos y compuestos fenólicos (García et al., 2012).

- Compuestos volátiles

Los compuestos volátiles forman parte de los aceites esenciales, siendo el grupo predominante los terpenoides ya que estos cuentan con masas moleculares bajas, son muy volátiles tales como: terpenos, monoterpenos y sesquiterpenos (Novoa, 2019).

Las características sensoriales del orégano están a cargo de los compuestos volátiles, dependiendo del tipo de especie. En el caso de la hoja del *Origanum Vulgare* se ha reportado monoterpenoides, monoterpenos, alcoholes, sesquiterpenos, aldehídos, cetonas y éteres (García et al., 2012).

- Lípidos

Según Novoa (2019), los lípidos son los encargados de potenciar las propiedades nutricionales y sensoriales de los mismos, además, constituyen parte importante de vitamina, pigmentos y ácidos esenciales.

Según García et al. (2012), en la hoja del *Origanum dictamnus* los lípidos representan el 9,7% p/p de las hojas secas. del cual el 7.8% de esta fracción lipídica, se identificaron varios tipos de lípidos no polares: esteroides, ésteres, alcoholes grasos, ácidos grasos libres, ceras, trazas de triacilglicéridos y ácidos triterpénicos. Por otra parte, el 1.9% de la fracción lipídica se compone de glicoproteínas y fosfolípidos. En cambio, en las hojas del *Origanum onites* están presente los ácidos linolénico y palmítico son los componentes más abundantes en la fracción lipídica, mientras que el hidrocarburo principal es el nonacosano, y de los fitoesteroides, el sitoesterol. En contraste, para el género *Lippia* no se han registrado estudios o informes sobre los lípidos presentes.

- Compuestos fenólicos

Gimeno Creus (2004), define como “aquel que incluye todas aquellas sustancias que contienen múltiples grupos funcionales fenol, unidos a estructuras aromáticas o alifáticas; además están presentes en el reino vegetal”.

La familia de los fenoles se clasifica en ácidos fenólicos, fenilpropanoides, xantonas, flavonoides, lignanos, biflavonoides, ligninas y taninos. (Frías-Zepeda & Rosales-Castro, 2021).

- Otros compuestos

De acuerdo al Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América, los componentes principales que se encuentran en 100 g de orégano seco (*O. vulgare*) son los expuestos en la siguiente Tabla 2.

Tabla 2. Componentes principales en 100 g de orégano seco

Compuesto	Cantidad (g)
Agua	9.93
Proteína	9
Grasas	4.28
Carbohidratos	68.92
Cenizas	7.87

Fuente: (García et al, 2012)

De igual manera, los elementos presentes, se mencionan los minerales como: calcio, hierro, magnesio, fósforo, potasio, sodio, zinc, cobre, manganeso y selenio en cantidades más pequeñas (FoodData Central, 2019).

#### 1.4.4 Actividad biológica de los componentes del orégano

- Actividad antioxidante

La capacidad antioxidante del orégano se atribuye principalmente a su contenido de compuestos fenólicos, su función es neutralizar la acción oxidativa de los radicales libres al liberar electrones en la sangre (Pérez, 2020; Arciniegas Cabrera, 2020).

En diversas variantes de orégano, se han identificado niveles significativamente elevados de antioxidantes, superiores a 140 mmol por cada 100 gramos. La evaluación del potencial antioxidante de los extractos de orégano se ha basado en su habilidad para frenar la peroxidación lipídica y salvaguardar el ADN (ácido desoxirribonucleico) contra los daños inducidos por los radicales hidroxilos. El aceite esencial de *O. vulgare* tiene actividad anti-radical y esta propiedad se le atribuye a los monofenoles carvacrol y timol (Arcila et al., 2012).

- Actividad antimicrobiana

La capacidad antimicrobiana viene dada por la composición química del aceite esencial de orégano, la cual se encuentra ligada al tipo de especie de orégano, factores geográficos, época de cosecha y el procedimiento de extracción (Paredes et al., 2007).

Los aceites esenciales que cuentan con una elevada cantidad de los compuestos de Timol y Carvacrol, son favorables para las propiedades antimicrobianas debido que



les permiten inhibir el crecimiento y la supervivencia de microorganismos, incluyendo bacterias y hongos (Carhuallanqui et al., 2020).

- Actividad insecticida

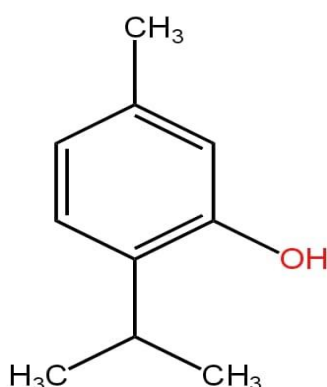
Los aceites esenciales derivados de plantas ofrecen una opción alternativa para salvaguardar los cultivos de las plagas. La actividad insecticida se evidencia por la concentración de dos compuestos como el carvacrol y timol dado que estos son los que se encuentran en mayor cantidad en los aceites esenciales; dicho así estos compuestos demuestran tener efectos disruptivos en los sistemas biológicos de los insectos, lo que lleva a la alteración de sus funciones vitales (Ortega-Nieblas et al., 2011).

### 1.5 Timol

El timol es un sólido cristalino de color blanco, con un olor característico, picante, ligeramente soluble en agua, sin embargo, en la mayoría de disolventes orgánicos es muy soluble (Weng, 2017).

El timol (2-isopropil-5-metilfenol) es un compuesto volátil, siendo este un derivado fenólico de un terpeno, por lo que es el monoterpeno más abundante en los aceites esenciales de las plantas correspondientes a la familia *Lamiaceae* (Rodríguez, 2017). En la Figura 1 se observa la estructura química del timol.

Figura 1. Estructura química del timol



La composición química de los aceites esenciales y la cantidad de timol presente en ellos se encuentra influenciada por diversos factores. Estos incluyen el tipo de planta, las condiciones geobotánicas (suelo, exposición a la luz, humedad y altitud), el método de cultivo (fertilizantes y agroquímicos), la época de siembra, el régimen de riego y la aplicación de pesticidas.

También influyen la época de recolección de la planta, el método de almacenamiento del material vegetal (fresco o seco), el proceso de extracción del aceite (extracción por arrastre de vapor, maceración, prensado o extracción con o sin solventes), el tipo de solvente empleado, la edad de la planta, posibles modificaciones genéticas, entre otros factores (Escobar et al., 2020).

Según Mora-Zuñiga et al. (2022), indican que la concentración de timol (% p/p) en los aceites de orégano varía entre el 14,4% y el 16,2%. En el caso del orégano silvestre, se registra un contenido de timol inferior de 5,9%.

En la Tabla 3 se muestra el porcentaje de timol y carvacrol que presenta el orégano cultivado en diferentes épocas del año.

*Tabla 3. Porcentaje de timol en diferentes épocas del año*

<b>Aceite Esencial</b>	<b>Timol</b>	<b>Carvacrol</b>	<b>Suma de timol y Carvacrol</b>	<b>Relación timol: carvacrol</b>
OCI	14.67 ± 0.8	23.60 ± 1.9	38.3 ± 2.7	1: 1.6 ± 0.1
OCV	14.47 ± 0.9	27.11 ± 1.4	41.6 ± 2.3	1: 1.9 ± 0.0
OCO	16.20 ± 1.4	32.63 ± 2.6	48.8 ± 4	1: 2.0 ± 0.0
OSO	5.91 ± 0.8	50.96 ± 8.1	56.9 ± 8.7	1: 8.6 ± 0.8

*Nota. OCI: orégano cultivado en invierno; OCV: orégano cultivado en verano; OCO: orégano cultivado en otoño; OSO: orégano silvestre de otoño*

Fuente: (Mora-Zuñiga et al., 2022)

### 1.5.1 Propiedades antimicrobianas

Los terpenos cuya estructura química está formada por unidades de isopreno. Se encuentran en su mayoría en forma de estructuras cíclicas, que se forman a partir del ácido mevalónico (Ninkuu et al., 2021). Por ello su propiedad antimicrobiana les permite afectar la membrana celular de los microorganismos, lo que provoca la fuga de iones y moléculas esenciales, así como el ingreso de sustancias que son tóxicas para la célula, además pueden lograr inhibir la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos de los microorganismos.

Siendo así el timol un potencial antimicrobiano contra bacterias grampositivas y en menor nivel sobre bacterias gram negativas (Mukurumbira et al., 2023).

Timol y Carvacrol son importantes debido que fragmentan la capa externa de las bacterias Gram negativas, liberando una porción de lipopolisacárido, lo que conlleva a un incremento en la permeabilidad del trifosfato de adenosina a través de la membrana citoplasmática, generando aberturas en esta última y resultando en la lisis de la bacteria (Carhuallanqui et al., 2020).

### **1.5.2 Propiedades antioxidantes**

Esta propiedad del timol se debe a su estructura fenólica dado que puede absorber y neutralizar radicales libres y exhibir propiedades redox. Además de sus propiedades antioxidantes directas, también puede aumentar la actividad de los antioxidantes endógenos y no enzimáticos (Torres, 2018).

### **1.5.3 Propiedades antiinflamatorias**

El timol inhibe la liberación de elastasa de neutrófilos humanos, un marcador de inflamación (Academia Nacional de Medicina, 2018).

En un estudio realizado por Habtemariam (2016), en el cual se examina el potencial terapéutico de los diterpenos presentes en el romero, incluido el timol, para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, se exhibe la actividad antiinflamatoria y antioxidante, siendo beneficioso para contrarrestar la neuroinflamación y el estrés oxidativo asociados con la enfermedad.

## **1.6 Espectroscopia UV-visible**

La absorción molecular que tiene lugar en la región ultravioleta y visible del espectro depende de la estructura electrónica de una molécula. En donde la absorción de energía es cuantificada y se obtiene como resultado un incremento de los electrones desde orbitales que se encuentran en estado basidio a orbitales que tiene una cantidad elevada de energía en un estado excitado (García, 2016).

La espectroscopia UV-Visible se fundamenta en la capacidad que tienen las moléculas para absorber las radiaciones que se encuentran en el espectro UV-visible, Las longitudes de onda que las moléculas pueden absorber y la eficiencia con la que absorben se basan en la estructura atómica y las condiciones del medio (Pérez & Almazán, 2015).

El espectro ultravioleta está formado por una gráfica de la longitud de onda en función de la intensidad de absorción. La absorción de un sinnúmero de longitudes es el resultado de los diferentes movimientos rotacionales y movimientos vibratorios que tiene una molécula; en consecuencia, se crea un rango en el que destaca la longitud de onda máxima ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) que representa a la cantidad de energía necesaria para que un electrón pase del estado básico a un estado excitado, con lo que se puede decir que cada molécula tiene su propio espectro de absorción (Pérez, 2016).

El intervalo de longitud de onda empleado abarca desde 160 nm hasta 780 nm. Esta técnica se utiliza para identificar grupos funcionales de moléculas y evaluar la concentración y fuerza de una sustancia. En el campo analítico de la química, la espectroscopia UV-visible se utiliza extensamente para identificar y cuantificar tanto compuestos orgánicos como inorgánicos en solución. Esta técnica permite obtener espectros de absorbancia de sustancias en solución o estado sólido, suministrando información cualitativa y cuantitativa sobre una determinada sustancia o compuesto. La espectroscopia UV-visible se destaca por su simplicidad, versatilidad, no destructividad y bajo costo, lo que la hace adecuada para un amplio espectro de compuestos orgánicos e inorgánicos (Tom, 2023).

## Capítulo 2. Metodología

En la presente investigación se llevó a cabo un estudio experimental de naturaleza cuantitativa. Este trabajo de tesis se realizó en el Centro de Estudios Ambientales (CEA) de la Universidad de Cuenca y tiene como finalidad obtener un extracto rico en timol de las hojas de *Origanum Vulgare L.*, a través de dos métodos de extracción: Soxhlet y arrastre de vapor. Las condiciones evaluadas fueron: tipo de muestra (hoja fresca y seca), concentración de solventes (etanol-agua destilada) y tiempo de extracción, estos dos últimos únicamente para el método Soxhlet.

Para determinar las mejores condiciones de extracción, antes mencionadas, de los dos métodos de extracción en este estudio en particular, se ejecutó un análisis estadístico inferencial, con el fin de identificar posibles diferencias estadísticamente significativas entre las distintas condiciones evaluadas. Este enfoque permitió realizar una evaluación de los resultados obtenidos, contribuyendo a la comprensión de la influencia de los parámetros como: el tiempo, condición de la materia prima, concentración de la mezcla del solvente y el método de extracción del compuesto de interés.

### 2.1 Materia prima

#### 2.1.1 Origanum Vulgare L.

El *Origanum vulgare L.*, es reconocido por su contenido de timol, un compuesto con propiedades antifúngicas. Por lo que fue seleccionado como materia prima con el propósito de obtener un extracto enriquecido en timol.

La planta de orégano (*Origanum Vulgare L.*), se adquirió durante los meses de junio y julio en la plataforma "El Arenal" ubicada en la ciudad de Cuenca, en el sector suroeste de la ciudad. Para adquirir la materia prima, se verificó mediante un análisis sensorial, que la planta cumpliera con los siguientes parámetros:

- Hojas color verde a verde grisáceo.
- Libre de enfermedades microbiológicas.
- Sin la presencia de plagas.
- No marchitas.
- Con la intensidad de su olor característico.

Como lo mencionan Han et al. (2017) estas características son indicativos del estado de frescura de la planta.

### 2.1.2 Etanol potable

El etanol potable que se usó es de la marca QuimitecLab, con un contenido de alcohol del 96%.

## 2.2 Acondicionamiento de la muestra fresca

A continuación, se detallan los materiales, reactivos y procedimiento usados para el acondicionamiento de la muestra fresca.

### 2.2.1 Materiales y reactivos

*Tabla 4. Materiales y reactivos para la preparación de muestra fresca*

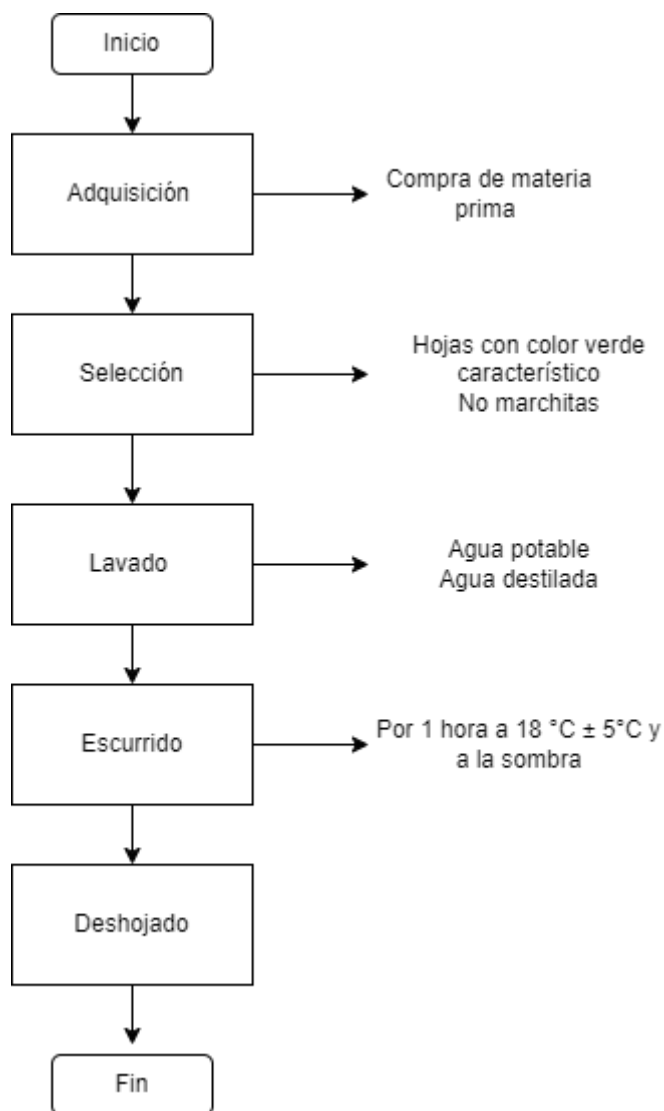
<b>Materiales</b>	<b>Reactivos</b>
Cernidor	Agua destilada
Cubetas	Agua potable
Bandejas	Planta de <i>O. vulgare L.</i>

### 2.2.2 Procedimiento

1. Se seleccionó la materia prima, descartando aquellas plantas que no cumplieran con los requerimientos anteriormente mencionados.
2. En los cernidores se lavaron las plantas de orégano con agua potable y luego con agua destilada, con el fin de eliminar materia inerte como: insectos, tierra, polvo y otras materias biológicas.
3. Las plantas se colocaron sobre bandejas y se dejaron a escurrir a temperatura ambiente ( $18^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) y a la sombra durante una hora cambiándola de posición para que el escurrido sea homogéneo.
4. Luego se deshojaron las plantas manualmente. Las hojas se recolectaron en cubetas.
5. La muestra fresca obtenida fue usada de inmediato para las extracciones Soxhlet y arrastre de vapor con el objetivo de que las hojas se conserven frescas.

### 2.2.3 Diagrama de bloques de la preparación de muestra fresca

Figura 2. Diagrama de bloques de la preparación de muestra fresca



### 2.3 Acondicionamiento de la muestra seca

A continuación, se detallan los materiales, reactivos y procedimiento usados para el acondicionamiento de la muestra seca.

### 2.3.1 Materiales y equipos

Tabla 5. Materiales y reactivos para la preparación de muestra seca

Materiales	Equipos	Reactivos
Cernidores	Licadora Oster	Agua destilada
Cubetas	Tamiz ASTM, malla #20	Agua potable
Bandejas		Planta de <i>O. vulgare L.</i>
Papel prensa		

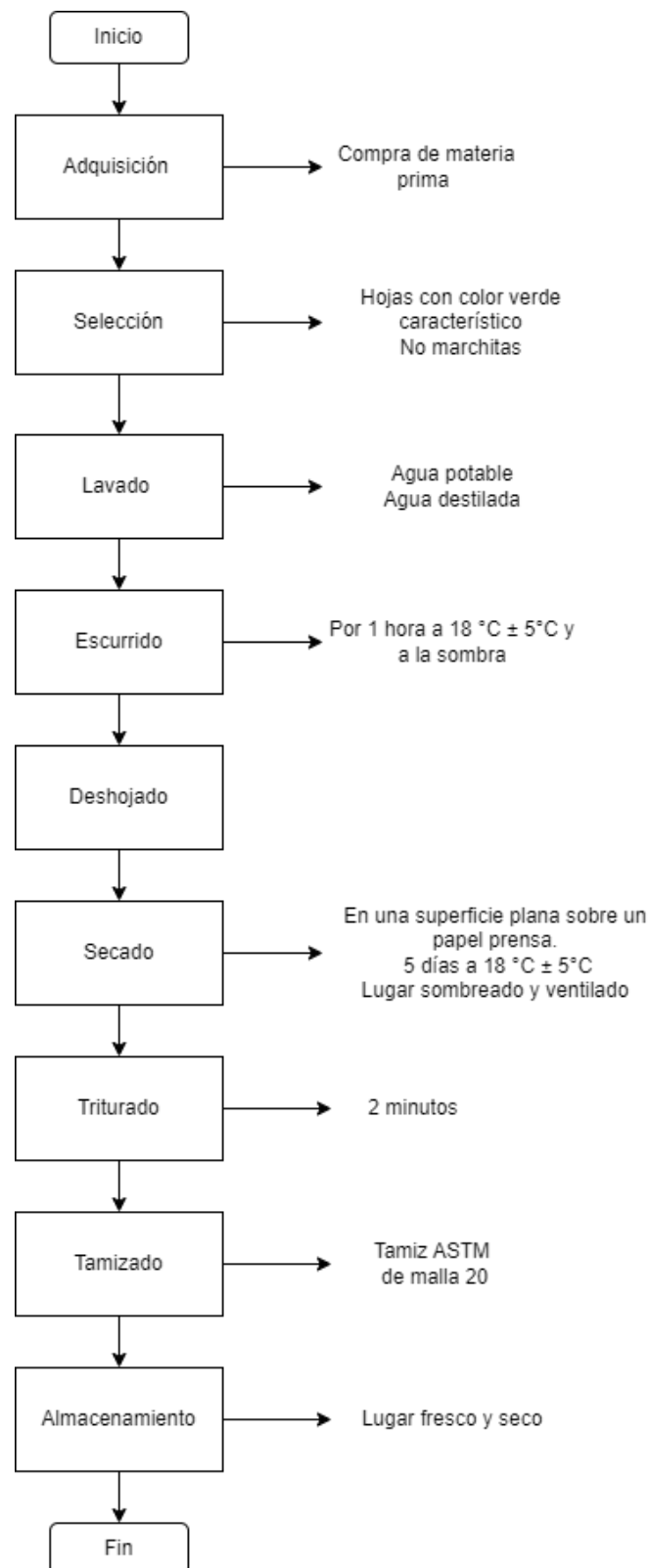
### 2.3.2 Procedimiento

1. Se siguieron los mismos pasos de: selección, lavado, escurrido y deshojado; mencionados en el apartado del acondicionamiento para la muestra fresca.
2. Las hojas fueron sometidas a un proceso de secado convectivo a la sombra sobre papel prensa dispuesto en una superficie plana, en un lugar bien ventilado, a una temperatura ambiente de  $18^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  durante un período de 5 días.
3. Las hojas secas fueron recolectadas en cubetas y posteriormente trituradas utilizando una licadora Oster. Se cargó el vaso hasta alcanzar los 0.5 litros y se procedió a triturar durante 2 minutos, logrando así la obtención de un polvo fino.
4. Se tamizó la muestra triturada a través de un tamiz ASTM de malla número 20.
5. La muestra obtenida se almacenó en un lugar seco y fresco.



### 2.3.3 Diagrama de bloques para la preparación de muestra seca

Figura 3. Diagrama de bloques para la preparación de la muestra seca



## 2.4 Métodos de extracción

Los métodos de extracción fueron empleados con el objetivo de obtener un extracto enriquecido en timol a partir de las hojas de orégano. La elección de las técnicas de extracción, específicamente: método Soxhlet y arrastre de vapor, se llevó a cabo con el propósito de evaluar la eficiencia de ambos en la obtención del timol. La repetición de cada prueba por triplicado se hizo para garantizar la reproducibilidad de los resultados y obtener datos estadísticamente confiables.

### 2.4.1 Método Soxhlet

A continuación, se describen los materiales, equipos, reactivos y procedimiento usados por los investigadores para realizar la extracción por el método Soxhlet.

#### 2.4.1.1 Materiales, equipos y reactivos

*Tabla 6. Materiales y reactivos para la extracción por método Soxhlet*

<b>Materiales</b>	<b>Equipos</b>	<b>Reactivos</b>
Luna de reloj	Equipo Soxhlet marca Glassco	Etanol potable
Espátula	Balanza analítica	Muestra seca o fresca
Papel filtro Whatman	Refrigerador	Agua destilada
Frascos ámbar de 250 ml		Refrigerante (agua potable)
Probeta de 100 ml		

#### 2.4.1.2 Procedimiento para la extracción por el método Soxhlet

1. Se elaboró un cartucho de papel filtro Whatman de dimensiones de 5 x 7 cm.
2. En una balanza analítica se pesaron 10 g del tipo de muestra, ya sea fresca o seca.
3. La muestra pesada se colocó dentro del cartucho previamente elaborado, éste a su vez se introdujo dentro de la camisa de sifonado del equipo Soxhlet.
4. Se procedió a medir con precisión un volumen total de 220 ml de la mezcla de solventes (etanol-agua destilada), el cual fue transferido al matraz de 250 ml. Cabe destacar que las mediciones de los solventes se realizaron de acuerdo con las proporciones específicas de etanol y agua destilada empleadas, siendo estas 100%:0%, 85%:15% y 70%:30%.

5. Se armó el equipo Soxhlet uniendo el matraz con la camisa de sifonado, y estos a su vez con el refrigerante.
6. Se dejó correr el líquido refrigerante (agua), se encendió la manta calefactora del equipo Soxhlet y se configuró el rango de temperatura de extracción de entre 60 y 70°C.
7. Se iniciaron las extracciones. En este estudio se emplearon tiempos de extracción de 6 y 12 horas.
8. Luego de finalizada la extracción, se desmonta el equipo Soxhlet y los extractos obtenidos se trasvasaron a frascos ámbar y se fueron almacenados a una temperatura de 4°C ± 2°C en un refrigerador.

En el Anexo A, se muestra el equipo de extracción Soxhlet, usado en la presente investigación.

## 2.4.2 Extracción por arrastre de vapor

A continuación, se describen los materiales, equipos, reactivos y procedimiento usados por los investigadores para realizar la extracción por arrastre de vapor.

### 2.4.2.1 Materiales, equipos y reactivos

*Tabla 7. Materiales y reactivos para la extracción con arrastre de vapor*

<b>Materiales</b>	<b>Equipos</b>	<b>Reactivos</b>
Luna de reloj	Balanza analítica	Agua destilada
Espátula	Hornilla eléctrica	Muestra seca o fresca
Frascos ámbar de 250 ml	Equipo de arrastre de vapor de marca Glassco	Refrigerante (agua potable)
Probeta de 100 ml	Puente de destilación de vidrio	
Termómetro de varilla	Refrigerador	
Corcho de goma y madera		
Soporte universal		
Pinzas mariposa		

#### 2.4.2.2 Procedimiento

1. En una balanza analítica se pesaron 60 g de muestra fresca o seca y se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 1000 ml del equipo de arrastre de vapor.
2. Se midieron 250 ml del solvente (agua destilada) y se colocaron en otro matraz de 1000 ml.
3. Se selló el matraz que contiene al solvente con un corcho de goma. Este corcho cuenta con dos agujeros, en uno se colocó el termómetro de varilla y en el otro se colocó el puente de destilación de vidrio que conecta el matraz Erlenmeyer que contiene a la muestra, con el matraz que contiene al solvente.
4. Se selló el matraz Erlenmeyer con otro corcho de goma que también cuenta con dos agujeros, uno para colocar el puente de destilación y otro para conectarlo con el refrigerante.
5. En la hornilla eléctrica se colocó el matraz que contenía el solvente.
6. Previamente se sujetó el refrigerante mediante pinzas mariposa a un soporte universal a la altura del matraz Erlenmeyer y se selló con un corcho de madera al que se conectó el puente de destilación proveniente del matraz que contiene a la muestra.
7. Una vez que se terminó de instalar el equipo, se encendió la hornilla eléctrica y se dejó correr el líquido refrigerante dando inicio a la extracción.
8. La extracción por arrastre de vapor se realizó durante 1 hora, a una temperatura de 96°C.
9. Los extractos fueron recolectados y almacenados en frascos ámbar a una temperatura de 4°C ± 2°C en un refrigerador.

En el Anexo B, se muestra el equipo de extracción por arrastre de vapor usado en la presente investigación.

#### 2.5 Curvas de calibración

Las curvas de calibración, se llevaron a cabo con el propósito de cuantificar el contenido de timol en los extractos obtenidos previamente mediante los métodos de extracción Soxhlet y arrastre de vapor. El objetivo principal de estas curvas fue determinar con precisión la cantidad de timol presente en el extracto a través de la medición de su absorbancia, por lo que se construyeron siete curvas de calibración.

### 2.5.1 Materiales, equipos y reactivos

Tabla 8. Materiales y reactivos para la elaboración de las curvas de calibración

Materiales	Equipos	Reactivos
Luna de reloj	Balanza analítica	Agua destilada
Espátula	Espectrofotómetro UV-Vis Thermo Scientific-Genesys 10S	Etanol potable
Balones de aforo	Software VISIONlite 5.3.	Extractos del orégano
Probetas		Estándar de timol, pureza >98.5%, marca Sigma-Aldrich
Pipetas		

### 2.5.2 Procedimiento para la elaboración de las de curvas de calibración

- Se preparó un blanco utilizando etanol-agua destilada, ajustando su concentración de acuerdo con la concentración de solventes utilizado en el proceso de extracción Soxhlet. Específicamente, se elaboraron blancos para cada concentración de etanol-agua destilada: 100%:0%, 85%:15%, y 70%:30%. En el caso del arrastre de vapor, el blanco consistió únicamente en agua destilada.
- Se elaboró una solución madre mediante la adición del estándar de timol al blanco previamente preparado. Se puede observar la concentración de la solución madre preparada para cada curva de calibración en los anexos (ver Anexo, O).
  - Para la curva de calibración del método de arrastre de vapor se tuvo en cuenta que el timol no es soluble en agua así que se usó la metodología de Fadhi (2014), donde menciona, que, para preparar una curva de calibración a base de agua para el timol, se tiene que diluir 0.1 mg de timol en 5 ml de etanol y esta solución se debe aforar en 100 ml de agua destilada.
- A partir de la solución madre se realizó un barrido espectral en el espectrofotómetro UV-Vis Thermo Scientific-Genesys 10S, para determinar la longitud de onda máxima de la solución. Los barridos espectrales de cada solución madre se pueden apreciar en los anexos (ver Anexos: C, D, E, F).
- En el software VISIONlite 5.3, se configuró la lectura de onda de medición a la que se desea calibrar la curva de calibración. La longitud de onda de medición es la misma que la longitud de onda máxima antes determinada.

5. A partir de la solución madre se prepararon 5 patrones de concentraciones de timol conocidas. Las concentraciones de los patrones se pueden observar en los anexos (ver Anexo, O).
6. Se colocaron los patrones en el espectrofotómetro UV-Vis Thermo Scientific-Genesys 10S. Con los resultados de la absorbancia obtenidos para cada concentración de timol, se construyó la curva de calibración. Se pueden observar las diferentes curvas de calibración en los anexos (ver Anexos: G, H, I, J, K, L, M).

## 2.6 Cuantificación del timol y cálculos para el rendimiento

Se cuantificó la cantidad de timol recuperado durante el proceso de extracción, con el fin de determinar la eficiencia de los métodos de extracción empleados.

Cabe mencionar que en esta investigación el rendimiento de timol del que se habla representa la cantidad de analito que se cuantificó a partir de la materia prima. No debe ser confundido con el rendimiento de timol que puede obtenerse en relación con los demás componentes presentes en el extracto.

### 2.6.1 Materiales, equipos y reactivos

*Tabla 9. Materiales y reactivos para la cuantificación de timol*

<b>Materiales</b>	<b>Equipos</b>	<b>Reactivos</b>
Balones de aforo	Balanza analítica	Agua destilada
Pera de succión	Espectrofotómetro UV-Vis Thermo Scientific-Genesys 10S	Etanol potable
Pipetas	Software VISIONlite 5.3.	Extractos del orégano

### 2.6.2 Procedimiento para la cuantificación de timol

1. Se preparó un blanco utilizando etanol-agua destilada, ajustando su concentración de acuerdo con la concentración de solventes utilizados en el proceso de extracción Soxhlet. Específicamente, se elaboraron blancos para cada concentración de etanol-agua destilada: 100%:0%, 85%:15%, y 70%:30%. En el caso del arrastre de vapor, el blanco consistió únicamente en agua destilada.

2. Para los extractos de timol obtenidos con el método Soxhlet se realizó una solución, donde, el factor de dilución fue de 125, este valor está en función del volumen de aforo sobre el volumen de la alícuota usada.
  - a. Para la cuantificación de los extractos de timol por el método de arrastre de vapor no se prepararon diluciones.
3. Se lavaron y homogeneizaron dos celdas de cuarzo del espectrofotómetro UV-Vis Thermo Scientific-Genesys 10S.
4. En una celda se colocó el blanco y en la otra celda la solución que contiene el extracto de timol.
5. Se realizó la cuantificación de timol en el espectrofotómetro y se anotaron los resultados.

### 2.6.3 Cálculo de la concentración real del extracto de timol

Se empleó la Ecuación 1 para determinar la concentración real del extracto de timol.

La ecuación indica que el resultado de concentración en ppm del espectrofotómetro UV-Vis Thermo Scientific-Genesys 10S, se debe multiplicar por el factor de dilución usado.

*Ecuación 1. Ecuación para calcular la concentración real*

$$C_r = C_o * F_{dilución} \quad (1)$$

Donde:

$C_r$ : Concentración real en ppm

$C_o$ : Concentración obtenida a través de la curva de la calibración en ppm

$F_{dilución}$ : Factor de dilución usado

### 2.6.4 Cálculo del rendimiento de la muestra

Se calculó los rendimientos del extracto de timol para realizar el análisis estadístico inferencial subsiguiente. Dado que, estos análisis estadísticos ofrecen una representación numérica que contribuye a una comprensión más precisa de los resultados obtenidos en el proceso de extracción.

Para el cálculo del rendimiento de timol en %p/p se realizó usando la Ecuación 2.

Ecuación 2. Ecuación para calcular el rendimiento

$$R = \left( \frac{C_r * V * 1e^{-6}}{m} \right) * 100 \quad (2)$$

Donde:

R: Rendimiento de timol obtenido en %p/p

$C_r$ : Concentración real en mg/l

V: Volumen de extracto recuperado en ml

m: Muestra de orégano usada en g

El valor  $1e^{-6}$  corresponde a las transformaciones de unidades de L a ml y de mg a g necesarias.

## 2.7 Análisis estadístico inferencial

El análisis estadístico inferencial se llevó a cabo para evaluar afirmaciones o hipótesis acerca de: la concentración de solventes (etanol-agua destilada), tiempo de extracción (6 y 12 horas), tipo de muestra (seca o fresca) y método de extracción (Soxhlet y arrastre de vapor), con la finalidad de tener suficiente evidencia estadística para aceptar o rechazar una hipótesis.

El análisis estadístico se realizó con el software IBM SPSS Statistics 26.

Para todos los análisis estadísticos se empleó: una confianza del 95%, un error del 5% y un nivel de significancia (p) de 0,05. Estos valores son predeterminados por el software.

Para la interpretación de los resultados se tuvo en cuenta que valores de  $p < 0,05$  rechazan la hipótesis nula y acepta la hipótesis alternativa. Mientras que valores de  $p > 0,05$  aceptan la hipótesis nula y rechazan la hipótesis alternativa (Walpole et al., 2012).

### 2.7.1 Pruebas de normalidad

En esta investigación la muestra (n) a evaluar son los datos de rendimiento de las extracciones. Por consiguiente, el tamaño de la muestra del método Soxhlet fue  $n=36$  y el tamaño de la muestra del arrastre de vapor fue  $n=6$ . Los dos tamaños de la muestra fueron menores a 50,  $n \leq 50$ , por esta razón, se aplicó el test de Shapiro-Wilks que es una prueba de normalidad que permite determinar si los datos siguen una distribución normal o no, es decir si son estadísticos paramétricos o estadísticos no paramétricos.



Las pruebas de normalidad se realizan planteando la hipótesis nula ( $H_0$ ) e hipótesis alternativa ( $H_1$ ). Las hipótesis planteadas fueron las siguientes.

$H_0$ : Los datos tienen una distribución normal.

$H_1$ : Los datos no tienen una distribución normal.

Con el valor de significancia ( $p$ ) que se obtenga se determinará si los datos son paramétricos o no paramétricos.

### 2.7.2 Análisis estadístico para la extracción con el método

#### Soxhlet

Es necesario recalcar que, a partir de los resultados obtenidos de la prueba de normalidad, se puede establecer si los datos pertenecen a los de una distribución normal o no, en base a esto se decide que prueba realizar, si un ANOVA para estadísticos paramétricos o Kruskal-Wallis para estadísticos no paramétricos.

En base a los resultados obtenidos de los análisis, se efectuó la prueba de Kruskal-Wallis, debido a que los datos obtenidos con el método Soxhlet cumplían con los siguientes requisitos:

- $n$ : número de muestras
- Tipo multigrupo (concentración de solventes, tipo de muestra y tiempo).
- Grupos independientes entre sí.
- Número de variables igual a uno (rendimiento).
- No cumplir con los supuestos del ANOVA de un factor (estadísticos no paramétricos).

La prueba de Kruskal-Wallis para el análisis de los rendimientos se usó para determinar si existía una diferencia estadísticamente significativa en las condiciones: concentración de solventes, tiempo de extracción y tipo de muestra; empleadas en la extracción Soxhlet.

Para ello se planteó una hipótesis nula ( $H_0$ ) y alternativa ( $H_1$ ) para los tres grupos de variables independientes:

A. Concentración de solventes etanol-agua destilada (100%:0%, 85%:15% y 70%:30%)

$H_0$ : No hay diferencias significativas en el rendimiento de extracción entre las distintas concentraciones de solventes.

$H_1$ : Existen diferencias significativas en el rendimiento de extracción entre las distintas concentraciones de solventes.

B. Tiempo de extracción (6 y 12 horas)

$H_0$ : No hay diferencias significativas en el rendimiento de extracción entre los tiempos empleados.

$H_1$ : Existen diferencias significativas en el rendimiento de extracción entre los tiempos empleados.

C. Tipo de muestra (seca o fresca)

$H_0$ : No hay diferencias significativas en el rendimiento de extracción entre el tipo de muestra seca y fresca.

$H_1$ : Existen diferencias significativas en el rendimiento de extracción entre el tipo de muestra seca y fresca

Adicionalmente se realizó una prueba post hoc, esta fue la U de Mann-Withney, con el fin realizar una comparación por parejas de las concentraciones de solventes de etanol-agua destilada (100%:0%, 85%:15% y 70%:30%) empleadas en la extracción Soxhlet y así identificar con cual se obtuvieron mejores resultados.

Para esto se planteó una hipótesis nula ( $H_0$ ) y alternativa ( $H_1$ ) para cada pareja de concentración de solventes etanol-agua destilada, las mismas se presentan a continuación:

1. Pareja 100%:0% y 85%:15%

$H_0$ : No hay diferencia significativa en el rendimiento de extracción entre las concentraciones de 100%:0% y 85%:15%.

$H_1$ : Existe una diferencia significativa en el rendimiento de extracción entre las concentraciones de 100%:0% y 85%:15%.

2. Pareja 100%:0% y 70%:30%

$H_0$ : No hay diferencia significativa en el rendimiento de extracción entre las concentraciones de 100%:0% y 70%:30%.

$H_1$ : Existe una diferencia significativa en el rendimiento de extracción entre las concentraciones de 100%:0% y 70%:30%.

3. Pareja 85%:15% y 70%:30%

$H_0$ : No hay diferencia significativa en el rendimiento de extracción entre las concentraciones de 85%:15% y 70%:30%.

$H_1$ : Existe una diferencia significativa en el rendimiento de extracción entre las concentraciones de 85%:15% y 70%:30%.

### 2.7.3 Análisis estadístico para la extracción por arrastre de vapor

Es necesario recalcar que, a partir de los resultados obtenidos de la prueba de normalidad, se puede establecer si los datos pertenecen a los de una distribución normal o no.

La prueba de Levene se hizo para evaluar la homogeneidad de las varianzas. Para realizar este test se plantearon las siguientes hipótesis nula ( $H_1$ ) y alternativa ( $H_0$ ):

$H_0$ : Se asumen varianzas iguales.

$H_1$ : No se asumen varianzas iguales.

Después de evaluar la homogeneidad de las varianzas, se llevó a cabo una prueba de t de Welch para investigar la posible existencia de una diferencia estadísticamente significativa en los rendimientos del extracto de timol entre los tipos de muestra, ya sea fresca o seca, utilizados en la extracción mediante arrastre de vapor.

Para realizar la prueba de t de Welch los datos obtenidos con el método arrastre de vapor debían cumplir con los siguientes requisitos:

- n número de muestras
- Grupos independientes entre sí.
- Número de variables igual a uno (rendimiento).
- No cumplir con los requisitos de la prueba t.

Los requisitos de la prueba de t incluyen: estadísticos paramétricos y varianzas iguales. Por lo que previo a hacer la prueba de t de Welch se realizó la prueba de Levene.

A continuación, se plantea una hipótesis nula ( $H_0$ ) y alternativa ( $H_1$ ) para la prueba de t de Welch.

A. Tipo de muestra (seca o fresca)

$H_0$ : No hay diferencia significativa en el rendimiento de extracción entre el tipo de muestra seca y fresca.

H<sub>1</sub>: Existe una diferencia significativa en el rendimiento de extracción entre el tipo de muestra seca y fresca.

### Capítulo 3. Resultados

En este apartado se encuentran los resultados obtenidos de esta investigación, los cuales se encuentran especificados en cada ítem.

#### 3.1 Resultados de las curvas de calibración

En la Tabla 10, se muestran: los coeficientes de correlación, las ecuaciones de las rectas y las longitudes de onda máxima, obtenidas del espectrofotómetro UV-Vis Thermo Scientific-Genesys 10S para cada curva de calibración construida para los métodos de extracción Soxhlet y arrastre de vapor.

Tabla 10. Coeficientes de correlación, ecuaciones de las curvas de calibración y longitud de onda máxima

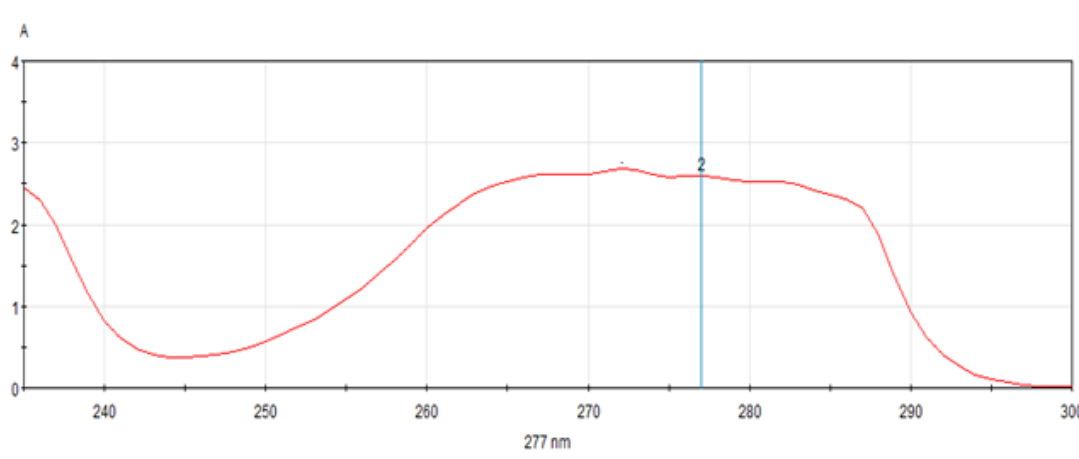
	Coeficiente correlación ( $R^2$ )	Ecuación de la recta de la curva de calibración	Longitud de onda máxima (nm)
Curva 100%:0% etanol-agua destilada de 40 a 180 ppm	0,99361	$1,191723 * 10^{-2}x + 0,22314018 * 10^{-2}$	277
Curva 85% etanol-agua de 5 a 150 ppm	0,994320	$1,223403 * 10^{-2}x + 1,641509 * 10^{-2}$	272
Curva 85% etanol-agua de 85 a 225 ppm	0,99072	$1,024463 * 10^{-2}x - 0,9025812 * 10^{-2}$	
Curva 70% etanol-agua de 10 a 150 ppm	0,99118	$1,345838 * 10^{-2}x - 0,2315742 * 10^{-2}$	272
Curva 70% etanol-agua de 100 a 250 ppm	0,98164	$8,241547 * 10^{-3}x - 0,7731339 * 10^{-2}$	
Curva de 90 a 250 ppm	0,99417	$8,74497 * 10^{-3}x - 0,3362733 * 10^{-2}$	274
Curva de 5 a 90 ppm	0,99962	$1,246343 * 10^{-2}x - 3,606052 * 10^{-2}$	

En esta tabla se observó que los coeficientes de correlación de las curvas de calibración fueron superiores a 0,98. Estos valores sugieren un buen ajuste al modelo lineal, indicando

una relación directamente proporcional entre la concentración conocida del timol y la absorbancia medida por el espectrofotómetro UV-Vis Thermo Scientific-Genesys 10S.

En la Figura 4 se muestra el barrido espectral de la curva de calibración de 100% etanol, en la que se observó un pico, señalado con el número "2", que corresponde a la longitud de onda máxima. En los anexos se pueden observar los diferentes barridos para cada curva (Ver Anexos: C, D, E, F).

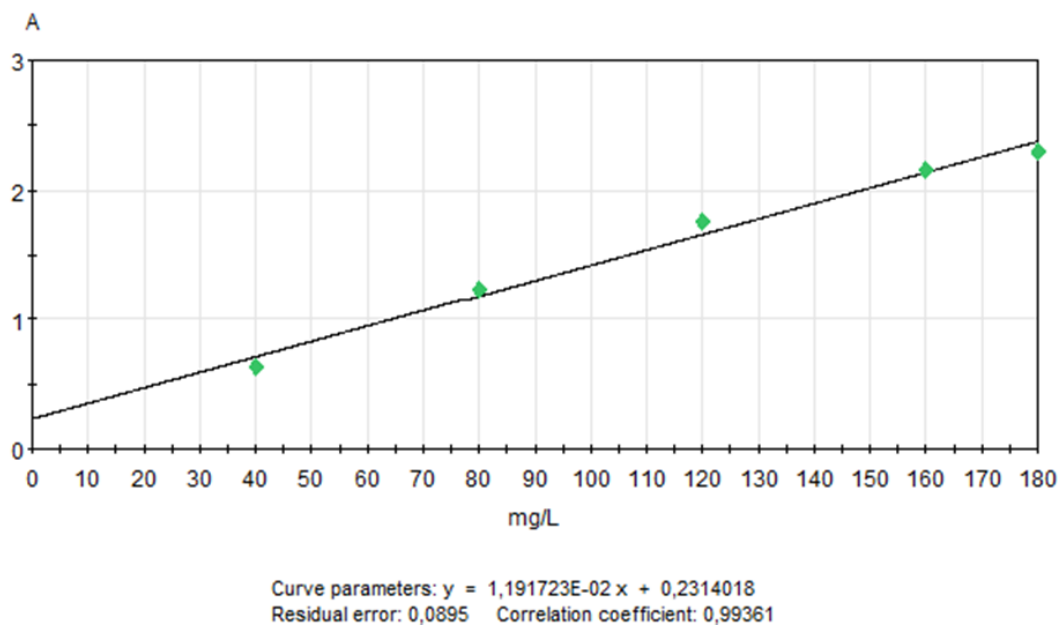
Figura 4. Espectro de absorción del timol obtenido para la concentración 100% etanol



Las longitudes de onda máxima alcanzadas se encontraron dentro del rango de longitud de onda que mencionan Chittratan et al. (2022), en donde definen que el rango de absorción del timol oscila entre 272 y 282 nm, esto puede verificarse con el espectro de absorción del timol que se presenta en el Anexo N, donde se muestra gráficamente el rango mencionado; puesto que las lecturas estuvieron dentro del intervalo de longitud de onda de timol, se sugiere que los resultados son precisos.

En la Figura 5, se observa el uso de 5 puntos de datos para construir cada curva de calibración, puesto que en espectrofotometría Uv-vis se requieren de mínimo 5 y máximo 6 puntos, para asegurar resultados confiables. Las curvas de calibración se construyeron utilizando un rango de concentraciones del analito conocidas, de mínimo 5 ppm y máximo 250 ppm. Este rango se estableció debido a que, para valores superiores a 250 ppm, las curvas presentaban coeficientes de correlación distantes a 1, en consecuencia, la respuesta de la absorbancia dejaba de ser directamente proporcional a la concentración del timol.

Figura 5. Curva de calibración 100% etanol



### 3.2 Resultados de las extracciones Soxhlet y arrastre de vapor

A continuación, en la Tabla 11, se presentan las concentraciones obtenidas del método Soxhlet con el espectrofotómetro Uv-vis, dichos valores se emplearon para calcular las concentraciones reales, mediante el uso de la Ecuación 1.

*Ecuación 1. Ecuación para calcular la concertación real.*

$$C_r = C_o * F_{dilución} \quad (1)$$



Tabla 11. Concentraciones en ppm obtenidas en el espectrofotómetro para la extracción con el método Soxhlet

Concentración del solvente (etanol- agua destilada)	Concentración en ppm			
	Hoja fresca de <i>Origanum Vulgare L.</i>		Hoja seca de <i>Origanum Vulgare L.</i>	
	6 horas	12 horas	6 horas	12 horas
<b>100%:0%</b>	132,29	121,48	31,10	25,66
	125,96	116,39	30,2	25,93
	129,3	126,89	37,97	25,39
<b>85%:15%</b>	53,37	128,9	49,66	45,36
	51,17	128,48	50,83	45,53
	52,06	129,98	52,38	54,32
<b>70%:30%</b>	44,9	47,26	115,9	53,02
	50,57	43,87	120,9	58,92
	46,89	50,28	118,21	60,39

A continuación, en la Tabla 12, se pueden observar los valores de las concentraciones reales obtenidos con el método Soxhlet mediante los cálculos con la Ecuación 1. Una previa revisión de los datos muestra que: las concentraciones de timol tienen precisión, dado que son cercanos entre sí; y que conforme aumenta el porcentaje de agua destilada en la mezcla de solventes, también aumenta la concentración de timol.

Tabla 12. Concentraciones reales en ppm calculadas para la extracción con el método Soxhlet

Concentración del solvente (etanol-agua destilada)	Concentración real en ppm			
	Hoja fresca de <i>Origanum Vulgare L.</i>		Hoja seca de <i>Origanum Vulgare L.</i>	
	6 horas	12 horas	6 horas	12 horas
<b>100%:0%</b>	3307,25	3037	3887,5	3207,5
	3149	2909,75	3775	3241,25
	3232,5	3172,25	4746,25	3173,75
<b>85%:15%</b>	6671,25	3222,5	6207,5	5670
	6396,25	3212	6353,75	5691,25
	6507,5	3249,5	6547,5	6790
<b>70%:30%</b>	5612,5	5907,5	14487,5	6627,5
	6321,25	5483,75	15112,5	7365
	5861,25	6285	14776,25	7548,75

A diferencia del método Soxhlet, las concentraciones obtenidas para la extracción con arrastre de vapor mediante el espectrofotómetro, son las concentraciones reales, debido a que no se hicieron diluciones, puesto que los valores obtenidos directamente del espectrofotómetro, se encontraban dentro de los límites de cuantificación de las curvas de calibración. Las concentraciones reales de timol obtenidas por arrastre de vapor se muestran en la Tabla 13, a continuación.

Tabla 13. Concentraciones reales en ppm obtenidas en el espectrofotómetro para la extracción con arrastre de vapor

Arrastre de vapor	Concentración real en ppm		
Hoja seca de <i>Origanum Vulgare L</i>	71,66	74,15	72,5
Hoja fresca de <i>Origanum Vulgare L.</i>	89,19	87,06	86,11

En la anterior tabla se pudo observar que el uso de la hoja fresca mejora la extracción con arrastre de vapor, puesto que se muestra una mayor concentración de timol.

En seguida, en las Tablas 14 y 15, se muestran los resultados de rendimiento del extracto de timol en %p/p, calculados con la Ecuación 2, para los métodos de extracción Soxhlet y arrastre de vapor.

Ecuación 2. Ecuación para calcular el rendimiento

$$R = \left( \frac{C_r * V * 1e^{-6}}{m} \right) * 100 \quad (2)$$

Tabla 14. Rendimiento de timol en %p/p obtenidos a partir de la extracción con el método Soxhlet

Concentración del solvente (etanol - agua destilada)	Rendimiento %p/p			
	Hoja fresca de <i>Origanum Vulgare L.</i>		Hoja seca de <i>Origanum Vulgare L.</i>	
	6 horas	12 horas	6 horas	12 horas
100%:0%	6,52	6,07	6,53	5,13
	6,27	5,79	6,30	5,61
	5,92	6,28	8,07	5,81
85%:15%	12,01	6,38	10,99	9,36
	12,54	6,13	9,91	10,41
	12,36	6,47	9,17	11,68
70%:30%	9,99	10,46	25,35	12,06
	11,32	10,42	25,84	13,26
	10,96	12,07	25,42	14,19

En la Tabla 14, se constató que los rendimientos obtenidos mediante la extracción Soxhlet muestran variaciones situadas entre el 5% y el 14% en peso. Se notó que los resultados obtenidos después de 6 y 12 horas son próximos entre sí, excepto en el caso de la extracción con muestra seca y una concentración de solvente del 70%:30% de etanol y agua destilada, los cuales alcanzaron un rendimiento de aproximadamente 25% p/p.

Tabla 15. Rendimiento de timol en %p/p obtenido con el método de arrastre de vapor.

Materia prima	Rendimiento %p/p		
Hoja seca	0,0190	0,0194	0,0193
Hoja fresca	0,0296	0,0305	0,0258

En la Tabla 15, se evidenció que los rendimientos obtenidos mediante el método de arrastre de vapor fueron cercanos al 0,02 % p/p. También se puede observar que se obtuvo un mayor rendimiento del extracto con la muestra fresca.

### 3.3 Resultados del análisis estadístico inferencial

A través de los resultados de los análisis estadísticos, fue posible tomar decisiones que ayudaron a determinar las mejores condiciones de: tiempo de extracción, concentración de solventes (etanol-agua destilada) y tipo de muestra (seca o fresca).

#### 3.3.1 Resultados de las pruebas de normalidad

A continuación, se presentan los resultados de significancia obtenidos al realizar la prueba de Shapiro-Wilks para evaluar la normalidad de la distribución de los datos de rendimiento para los métodos de extracción (Soxhlet y arrastre de vapor).

*Tabla 16. Resultados de las pruebas de normalidad con Shapiro-Wilks*

Métodos de extracción	Significancia (p)	Decisión
Soxhlet	0,000	Rechaza la hipótesis nula
Arrastre de vapor	0,074	Acepta la hipótesis nula

En la Tabla 16, se muestran los resultados de las pruebas de normalidad.

Para el método Soxhlet se obtuvo que  $p < 0,05$ ; por ende, se rechazó la hipótesis nula y se aceptó la hipótesis alternativa, esta última asegura que los datos no siguen una distribución normal, por lo tanto, se determinó que los datos eran estadísticos no paramétricos.

En contraste, con el método de arrastre de vapor se obtuvo que  $p > 0,05$ ; por lo que se aceptó la hipótesis nula, que asegura que los datos siguen una distribución normal, por lo tanto, se determinó que los datos eran estadísticos paramétricos.

#### 3.3.2 Resultados del análisis estadístico inferencial para la extracción Soxhlet

Una vez que se ha determinado que los datos corresponden al tipo no paramétrico se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis para el análisis de los rendimientos con el fin de determinar si existe una diferencia estadísticamente significativa en las condiciones: concentración de solventes y tiempo de extracción, empleadas en la extracción Soxhlet

A continuación, se muestran los resultados para la prueba de Kruskal-Wallis. Estos resultados fueron obtenidos con el Software IBM SPSS Statistics.

*Tabla 17. Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis aplicada a la extracción Soxhlet*

Parámetro	Significancia (p)	Decisión
A. Concentración de solventes etanol-agua destilada	0,000	Rechaza la hipótesis nula
B. Tiempo de extracción	0,114	Acepte la hipótesis nula
C. Tipo de muestra	0,311	Acepta la hipótesis nula

Al analizar los resultados presentados en la Tabla 17, se observó que, para el parámetro de concentraciones de solventes (etanol-agua destilada), el nivel de significancia fue  $p < 0,05$ . Por lo tanto, se rechazó la hipótesis nula y se aceptó la hipótesis alternativa. Esta hipótesis afirmaba que existía una diferencia estadísticamente significativa en las concentraciones de solventes.

En cuanto a los tiempos de extracción, se determinó que  $p > 0,05$ , lo que llevó a aceptar la hipótesis nula. Esta hipótesis sostiene que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre una extracción de 6 horas y una de 12 horas.

En relación con los tipos de muestra, se encontró que  $p > 0,05$ . Por lo tanto, se optó por aceptar la hipótesis nula, la cual señala que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre una extracción Soxhlet realizada con muestra seca y una extracción hecha con muestra fresca.

### **3.3.2.1 Resultados de la prueba de U de Mann-Whitney para concentraciones de solventes de etanol-agua destilada**

Con la prueba de Kruskal-Wallis se determinó que existía una diferencia estadísticamente significativa entre las distintas concentraciones de solventes etanol-agua destilada usadas para la extracción Soxhlet, por lo tanto, fue necesario realizar una prueba post hoc.

La prueba post hoc que se realizó fue la U de Mann-Withney. A continuación, se muestran los resultados obtenidos del software IBM SPSS Statistics para este test.

Tabla 18. Resultados de la prueba U de Mann-Whitney por parejas de concentraciones de solventes usados para la extracción con el método Soxhlet

Comparación por parejas de concentración de solventes (etanol-agua destilada)	Significancia (p)	Decisión
100%:0%-85%:15%	0,004	Rechaza la hipótesis nula
100%:0%-70%:30%	0,000	Rechaza la hipótesis nula
85%:15%-70%:30%	0,058	Acepta la hipótesis nula

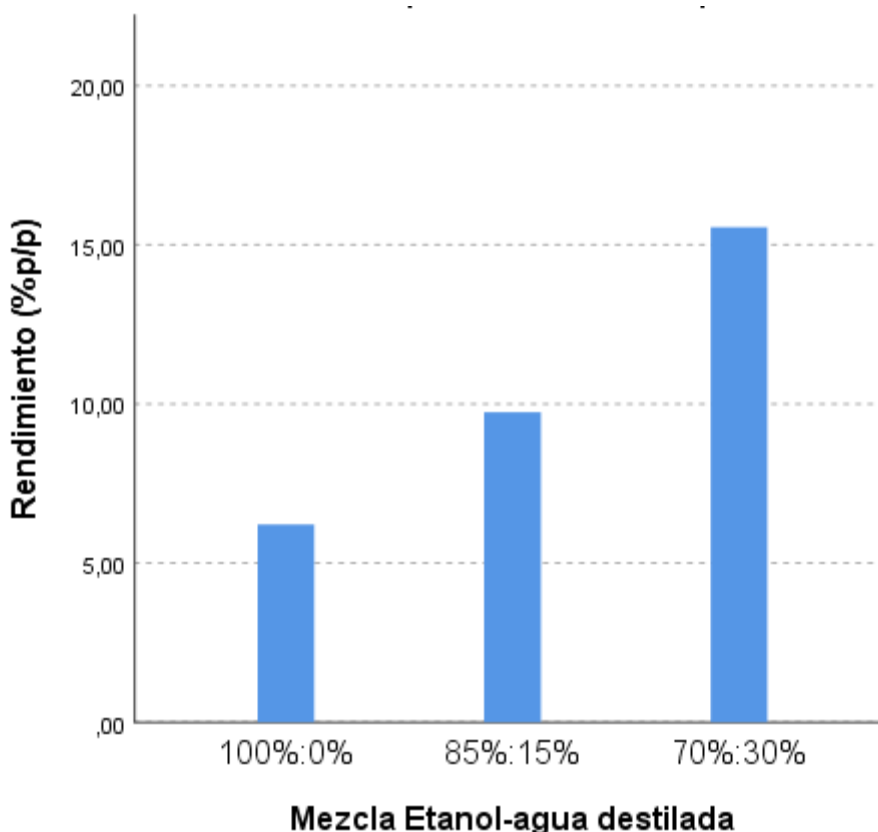
En la Tabla 18, se evidencia que para la pareja de concentraciones de solventes 100%:0% y 85%:15%, el valor de p fue menor que 0.05; por consiguiente se rechazó la hipótesis nula y se aceptó la hipótesis alternativa, ésta última mencionaba que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la pareja, es decir, los rendimientos de extracto de timol obtenidos con una concentración de solventes de 100%:0%, no se asemejan a los rendimientos determinados con una concentración de solventes 85%:15% etanol-agua destilada.

En cuanto a la pareja de concentración de solventes 100%:0%-70%:30%, se obtuvo que  $p < 0,05$ ; por ende, también se rechazó la hipótesis nula y se aceptó la hipótesis alternativa, ésta asegura que existe una diferencia estadísticamente significativa, puesto que, los rendimientos de extracto de timol obtenidos con una concentración de solventes de 100%:0%, difieren de los rendimientos determinados con una concentración de solventes 70%:30% etanol-agua destilada.

Para la pareja de concentración de solventes 85%:15%-70%:30%, se obtuvo que  $p > 0,05$ ; por lo que se aceptó la hipótesis nula, ésta señalaba que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las parejas, por lo tanto, no existe suficiente evidencia para asegurar que los rendimientos obtenidos entre la pareja de solventes 85%:15%-70%:30% etanol-agua destilada fueron diferentes.

Junto con el análisis estadístico se obtuvo un diagrama de barras, Figura 6, en el que se puede visualizar la relación proporcional entre los rendimientos de extracto de timol y las concentraciones de solventes etanol-agua destilada usados para el método Soxhlet.

Figura 6. Diagrama de barras de concentraciones de solventes con respecto al rendimiento



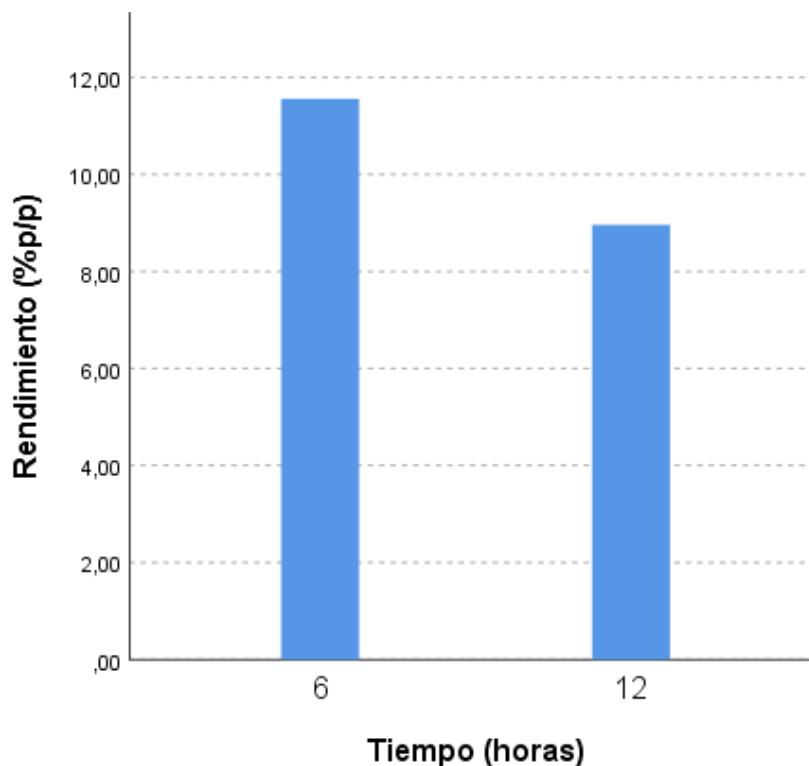
Las medias de los rendimientos de extracto de timol, obtenidos para las distintas concentraciones de solventes 100%:0%, 85%:15% y 70%:30% etanol-agua destilada fueron: 6,19%, 9,78% y 15,11% p/p, respectivamente. Aquello permite analizar más a fondo el diagrama de barras de la Figura 6, en éste se observó que las medias de los rendimientos son más grandes conforme a mayor sea el porcentaje de agua destilada usada como solvente. También es más perceptible la porque de los resultados de la prueba de U de Mann Whitney, por ejemplo: es evidente que la media de la concentración 100%-0% es inferior a las medias de los rendimientos de las otras dos concentraciones, por lo que se dijo que existía una diferencia estadísticamente significativa. A simple vista se puede decir que la concentración de solventes 70%:30% fue con la que se obtuvieron mejores rendimientos de extracto de timol. Sin embargo, como se mencionó antes, no existe suficiente evidencia estadística para determinar que los rendimientos de las concentraciones 70%:30% y 85%:15% sean significativamente diferentes, por ende, se determinó que la extracción podría realizarse con cualquiera de estas dos concentraciones.



### 3.3.2.2 Resultados del análisis estadístico aplicado a los tiempos de extracción

A continuación, en la Figura 7, se muestra un diagrama de barras con el que se visualizó la variación de los tiempos de 6 y 12 horas usados durante la extracción con el método Soxhlet con respecto del rendimiento del extracto de timol.

Figura 7. Diagrama de barras del tiempo con respecto al rendimiento de extracto de timol

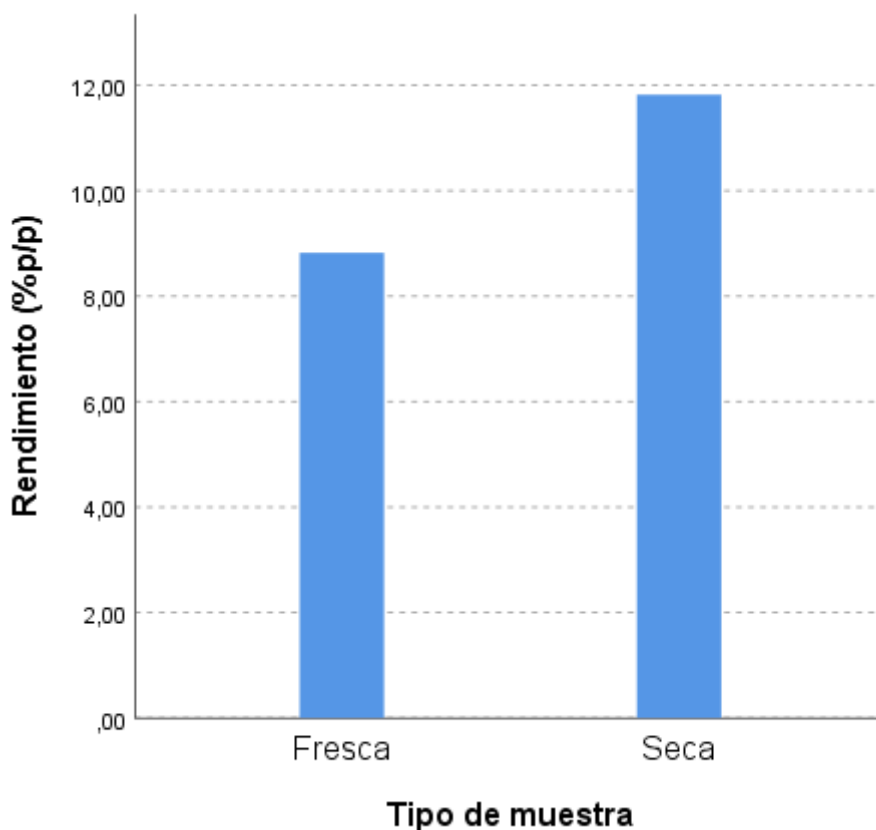


Las medias de los rendimientos de extracto de timol, obtenidos para los tiempos de extracción de 6 y 12 horas con el método Soxhlet fueron: 11,97% y 8,75% p/p, respectivamente. Con lo citado anteriormente, se analizó la Figura 7, en la que se observó que la media de los rendimientos de extracto de timol obtenidos con 6 horas era superior a la media de los rendimientos obtenidos con 12 horas. No obstante, con la prueba de Kruskal-Wallis se determinó que no existía suficiente evidencia estadística para afirmar que la diferencia entre una extracción con 6 y 12 horas sea significativa.

### 3.3.2.3 Resultados del análisis estadístico aplicado al tipo de muestras

A continuación, se muestra un diagrama de barras donde se muestra la relación entre el tipo de muestra, ya sea fresca o seca, con respecto a los rendimientos del extracto de timol.

Figura 8. Diagrama de barras del tipo de muestra con respecto al rendimiento



Las medias de los rendimientos de extracto de timol, obtenidos mediante el método Soxhlet, fueron del 11,95% p/p para el tipo de muestra seca y del 8,77% p/p para la muestra fresca. Con lo expuesto anteriormente se analizó la Figura 8 en la que se observó que continuación, la media de los rendimientos de extracto de timol obtenidos con muestra seca era superior a la media de los rendimientos obtenidos con muestra fresca. Sin embargo, con la prueba de Kruskal-Wallis se determinó que no existía suficiente evidencia estadística para afirmar que la diferencia entre una extracción con muestra fresca y con muestra seca sea significativa.

### 3.3.3 Resultados del análisis estadístico inferencial para la extracción con arrastre de vapor

En el apartado de los resultados para las pruebas de normalidad se determinó que los datos de los rendimientos del extracto de timol obtenidos con el arrastre de vapor eran del tipo estadístico paramétrico. Además, fue necesario determinar la homogeneidad de las varianzas aplicando una prueba de Levene.

A continuación, se muestran los resultados para este test. Estos resultados fueron obtenidos con el Software IBM SPSS Statistics.

*Tabla 19. Resultado de la prueba de Levene para varianzas iguales*

<b>Significancia (p)</b>	<b>Decisión</b>
0,033	Rechaza la hipótesis nula

En la Tabla 19, se observó que el nivel de significancia (p) fue menor a 0,05; por consiguiente, se rechazó la hipótesis nula y se aceptó la hipótesis alternativa. Esta última hipótesis asume que las varianzas no son iguales.

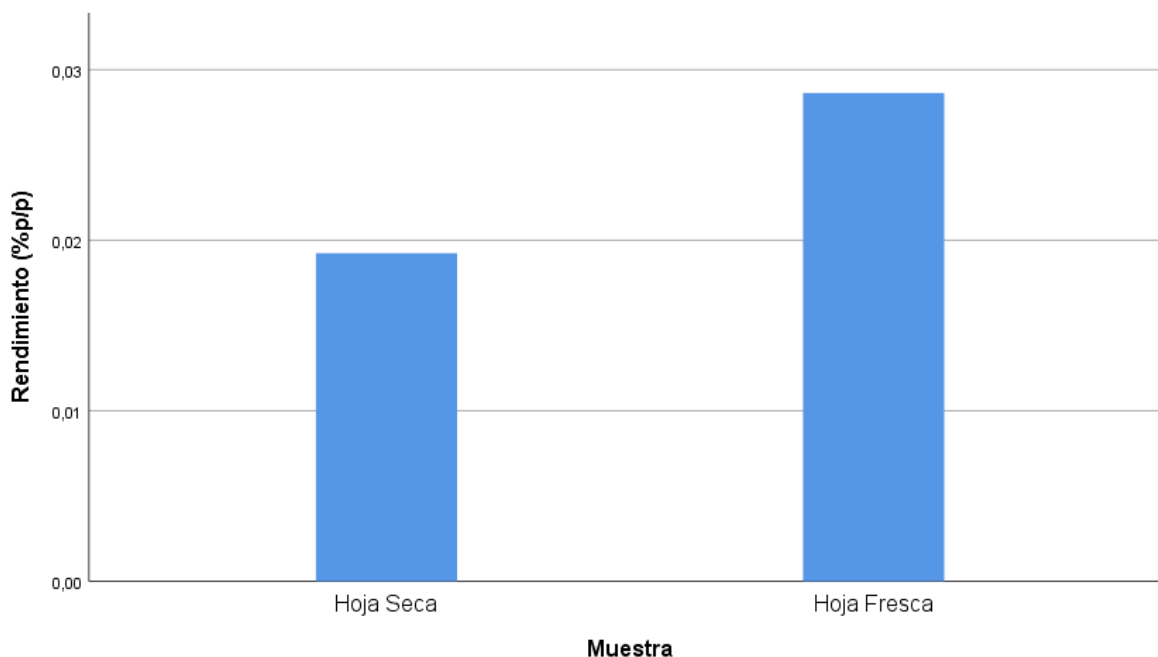
Conociendo que los datos son estadísticos paramétricos y las varianzas no son homogéneas se aplicó una prueba de t de Welch. Los resultados de este test se muestran a continuación.

*Tabla 20. Resultados de la prueba de t de Welch para los rendimientos obtenidos con el arrastre de vapor*

<b>Significancia (p)</b>	<b>Decisión</b>
0,022	Se rechaza la hipótesis nula

Con el resultado de la prueba de t de Welch que se muestra en la Tabla 20, se decidió rechazar la hipótesis nula, puesto que  $p < 0,05$ ; por tanto, se aceptó la hipótesis alternativa que menciona que existe una diferencia estadísticamente significativa entre el tipo de muestra seca y fresca.

Figura 9. Diagrama de barras del tipo de muestra con respecto al rendimiento usados para el arrastre de vapor



Las medias de los rendimientos de extracto de timol para los tipos de muestra fresca y seca obtenidos con el arrastre de vapor fueron: 0,029% p/p y 0,019% p/p, respectivamente. Con lo antes mencionado se analizó la Figura 9 en la que se observó que la media de los rendimientos de extracto de timol obtenidos en la muestra fresca de hojas de orégano era superior, esto también puede verificarse visualmente. Con los resultados de la prueba de t de Welch, se determinó que existía una diferencia estadísticamente significativa entre el tipo de muestra seca y muestra fresca; por ese motivo se puede afirmar que, para obtener un mejor rendimiento del extracto de timol, la extracción por arrastre de vapor debe hacerse con muestra fresca.

#### Capítulo 4. Discusión

En este estudio se trabajó solo con las hojas de la planta de orégano (*Origanum Vulgare L.*) debido a su significativamente mayor contenido de timol en comparación con el tallo y la raíz, según lo informado por Han et al. (2017) en su estudio: *Composición química y actividades antioxidantes de los aceites esenciales de diferentes partes del orégano*, donde encontraron porcentajes de timol de 18,81%, 3,46% y 1,08% p/p para las hojas, el tallo y la raíz, respectivamente. Estos datos los respaldan Ricciardi et al. (2014) ya que obtuvieron 20,5% p/p para las hojas, 11,4% p/p para el tallo y 6,2% p/p para la raíz. En las pruebas con muestra fresca y seca, se utilizaron solo las hojas de orégano. El tallo no se utilizó debido a que su tamaño era demasiado grande para el cartucho de extracción y podía romper este último. Otra razón del uso de las hojas de orégano fue que, durante el acondicionamiento de la muestra seca, al triturar y tamizar la muestra, los tallos secos no se trituraban y provocan dificultades al momento de tamizarse, por consiguiente, gran cantidad de tallos se desperdiciaban. Por otra parte, no fue posible adquirir las plantas de orégano con su raíz, de ahí que no fueran consideradas en este estudio.

La concentración de timol que puede obtenerse del orégano se ve influenciada por otros factores como: la época de cosecha, la altitud, el clima, tipo de especie, etc. La temporada de cosecha puede tener impacto debido al ciclo de crecimiento de la planta. Vogel et al. (2011) en su estudio denominado *Efecto de la época de cosecha sobre el rendimiento de producto deshidratado y de aceite esencial en hoja de orégano (Origanum vulgare L.)*, encontraron que los niveles de timol en el aceite esencial del orégano son más altos en la etapa de floración que en la etapa vegetativa; sin embargo, en este estudio no fue posible tener un control completo del ciclo de crecimiento del orégano y en el lugar de abastecimiento de la materia prima no se encontraron gran cantidad de plantas que mostrarán estar en su etapa de floración, por lo que se optó por escoger aquellas que estaban en su etapa vegetativa; esto con el fin de mantener las mismas condiciones para todas las pruebas realizadas. Tal como se ha expuesto, condiciones como la altitud, el clima, temperatura o humedad no fueron posibles controlar durante esta investigación, ya que el proveedor de las muestras de orégano fue un centro comercial, donde estas condiciones pueden variar de un proveedor a otro. Además, no se disponía de un lugar adecuado para cultivar el orégano y controlar de forma precisa estas condiciones.

El método de extracción es otro factor que podría afectar al rendimiento del timol extraído de la especie *Origanum vulgare L.* Se consideraron varios métodos de extracción como: arrastre de vapor, extracción con solventes (Soxhlet), maceración, baño ultrasónico, fluidos supercríticos e irradiación por microondas; estos dos últimos fueron descartados debido a

que no se disponía del equipo necesario en el Centro de Estudios Ambientales (CEA) de la Universidad de Cuenca. Se rechazó el método de extracción por maceración, puesto que, el tiempo empleado para la obtención del timol es demasiado extenso y el fin de esta investigación fue encontrar el método más eficiente posible. Los tiempos de extracción por maceración pueden llegar a ser tan extensos que para obtener resultados con porcentajes cercanos al 20% p/p en cuanto a rendimiento de timol de la especie *Origanum vulgare L.*, se debe trabajar la muestra por mínimo 48 horas, esto se evidencia en la investigación de Atasay et al. (2011) y Ricciardi et al. (2012). Por esta razón, se descartó la maceración puesto que usa largos tiempos de extracción comparados con los de arrastre de vapor de 1 hora y extracción Soxhlet de 6 y 12 horas, los cuales se usaron en esta investigación. Por otro lado, Yusoff et al. (2022) mencionan que la extracción por ultrasonido produce tiempos más cortos de extracción; sin embargo, se rechazó utilizar esta metodología, dado que, al momento de desarrollar esta investigación, no hubo disposición del equipo, a causa de que estaba siendo empleado en otros estudios. Finalmente, se optó por los métodos Soxhlet y arrastre de vapor, puesto que éstos son los métodos por excelencia para la obtención de aceites esenciales como lo mencionan Cavallaro et al. (2023), esto se respalda con la información expuesta por Vanegas (2016), donde menciona que la extracción con los métodos Soxhlet y arrastre de vapor, se logra obtener un rendimiento de 30,67% y 2,3% p/p, respectivamente.

La metodología de secado, para obtener la muestra seca de las hojas del orégano, se realizó de acuerdo a lo mencionado por Leyva-López et al. (2017) y Caputo et al. (2022), quienes estudiaron tres tipos de secado: irradiación por microondas, convectivo a la sombra y convectivo con calor; siendo el primer método aquel con el que se obtuvo un menor daño en los tejidos de las hojas. A pesar de esta evidencia, la falta de equipo llevó a la elección del segundo método más eficaz presentado en este estudio, que resultó ser el secado convectivo a la sombra.

Gullón et al. (2017) en su investigación *Optimización de la extracción con solventes de antioxidantes de hojas de Origanum Vulgare L. mediante metodología de superficie de respuesta: Caracterización y evaluación de sus propiedades bioactivas* mencionan que la temperatura óptima de extracción puede variar en función del tipo de muestra con la que se trabaje. Rayess et al. (2019) en su libro: *Técnicas modernas de extracción de bioactivos a base de hierbas*, señalan que las temperaturas altas pueden facilitar la extracción de los compuestos bioactivos, puesto que al aumentar la temperatura de extracción también aumenta la solubilidad del solvente, hasta cierto punto en el que una temperatura mayor implica la degradación de los compuestos. Los resultados de los estudios realizados por Rivas Pérez et al. (2017) y Rodrigues et al. (2021), corroboran lo antes expuesto, dado que

obtuvieron altos rendimientos de extracción de compuestos fenólicos a temperaturas entre 60 y 70 °C, de ahí que se escogiera este rango de temperatura para realizar las extracciones con el método Soxhlet. Además, durante la experimentación se observó, que, a temperaturas mayores, la mezcla de solventes (etanol-agua destilada) provocó un burbujeo que a su vez causó que la camisa rebote sobre el matraz, lo que en consecuencia pudo causar un accidente.

Se seleccionó etanol y agua destilada como solventes para la extracción Soxhlet, puesto que el timol es fuertemente soluble en etanol (Kowalczyk et al., 2020). Y usar agua como solvente reduce el consumo de etanol. La alta solubilidad del timol en etanol se atribuye a la naturaleza polar del compuesto. El timol, al ser un derivado de los compuestos fenólicos, presenta un grupo aromático unido a su grupo funcional hidroxilo, que es polar. El etanol, a su vez, contiene un grupo hidroxilo, que también es polar. La solubilidad mejorada del timol en etanol se debe a las interacciones favorables entre los grupos polares de ambos compuestos, lo que facilita su disolución en este solvente (Loong et al., 2014). La solubilidad del timol en agua es baja debido a la presencia del grupo metilo del timol. El grupo metilo es un grupo funcional hidrofóbico, lo que significa que tiene una afinidad muy baja por las moléculas de agua. Por lo tanto, las moléculas de timol no se disuelven fácilmente en agua (Sanz Tejedor, 2016).

En la Tabla 17, en el apartado de los resultados del análisis estadístico para el método Soxhlet se encontró que existía una diferencia estadísticamente significativa entre las distintas concentraciones de solventes de etanol-agua destilada (100%:0%, 85%:15% y 70%:30%), en consecuencia, para identificar cuál concentración de solventes presentaba una diferencia significativa se realizó una prueba de U de Mann-Whitney por parejas de concentraciones de solventes. Los resultados exhibidos en la Tabla 18 indicaron que las parejas de solventes etanol-agua destilada de 100%:0%-85%:15% y 100%:0%-70%:30% mostraban una diferencia estadísticamente significativa entre sí, dado que el rendimiento promedio obtenido con 100%:0% etanol-agua destilada fue de 6,19% p/p; que difiere significativamente con los rendimientos promedio obtenidos con 85%:15% y 70%:30% que fueron 9,78% p/p y 15,11% p/p, respectivamente. Por otra parte, con los resultados de la Tabla 18 se demostró que entre la pareja de porcentajes 85%:15% y 70%:30% etanol-agua destilada, no existía una diferencia estadísticamente significativa, por consiguiente, la extracción podría realizarse con ambas concentraciones de solventes. Sin embargo, se resolvió determinar que la mejor concentración de solventes que se puede emplear para el método Soxhlet es la de 70%:30%, ya que reemplaza hasta un 30% la cantidad de etanol por agua destilada, lo cual es ventajoso puesto que disminuye el consumo del solvente orgánico (etanol), sin afectar al rendimiento del extracto de timol, si no que por el contrario lo incrementa. Esta decisión se refuerza con

el estudio *Extracción de compuestos fenólicos con actividad antioxidante a partir de orégano* realizado por Muñoz et al. (2015), donde llegaron a la conclusión que para obtener una mayor cantidad de rendimiento con respecto a los compuestos fenólicos es propicio el uso de la mezcla etanol-agua destilada en una proporción 70%:30%.

El hecho de que se haya obtenido un mejor rendimiento de extracto de timol con la concentración 70%:30% etanol-agua destilada pudo estar influenciado por la constante dieléctrica de estos solventes, Mohd-Setapar et al. (2014), señalan que al aumentar la constante dieléctrica aumenta la polaridad de la solución; se indican que la constante dieléctrica del agua es  $\epsilon = 80$  y de la solución 70%:30% etanol-agua destilada es  $\epsilon = 24,3$ ; es decir, a mayor cantidad de etanol menor es la constante dieléctrica. Por lo tanto, se puede afirmar que las soluciones que contengan un mayor porcentaje de agua son las que presentan una mayor constante dieléctrica y por tanto una mayor polaridad, lo que en consecuencia mejora los rendimientos de extracción de timol. A pesar de que, el timol es un fenol y no es soluble en agua, se recomienda el uso de ésta como solvente en la extracción Soxhlet, ya que como lo mencionan Plaskova & Mlcek (2023) ésta facilita la difusión eficiente de los componentes a través de los tejidos vegetales, contribuyendo así a obtener un mejor rendimiento en la extracción. En resumen, con una mezcla de etanol-agua destilada como solvente, se llega a obtener mayor rendimiento comparado con usar un solo solvente en la extracción de compuestos fenólicos.

Jitan et al. (2018) en su trabajo titulado *Compuestos fenólicos de plantas: Extracción y aplicación a la salud humana* indican que el tiempo de extracción con el método Soxhlet puede oscilar entre 2 y 12 horas; pero recomiendan como punto de partida una extracción de un periodo de alrededor de 6 horas con una temperatura de 100°C. Sin embargo, se hace énfasis en que el protocolo para la extracción Soxhlet debe ser ajustado al tipo de muestra que se usa. López-Bascón & De Castro (2020) se refieren al método Soxhlet como una extracción que puede requerir de tiempos de contacto que van desde 6 horas llegando a prolongarse incluso hasta las 24 horas, todo esto para asegurar la extracción del analito de interés. Se tuvo en cuenta que durante los ensayos experimentales el primer sifonado se daba aproximadamente a 1.5 horas y luego de las primeras 3 horas los sifonados comenzaban a ser constantes, llegando a producirse cada hora. Si se hubiera considerado hacer una extracción de 2 horas, el proceso no habría tenido el tiempo suficiente para completar un sifonado. Con las anteriores consideraciones y con el fin de estudiar la influencia del tiempo en las extracciones Soxhlet, se determinó que lo más eficiente fue realizar extracciones de 6 y 12 horas.



En la Tabla 17, en el apartado de los resultados del análisis estadístico para la extracción Soxhlet, se obtuvo que los tiempos de 6 y 12 horas empleados no mostraban una diferencia estadísticamente significativa, por lo que se determinó que la extracción con el método Soxhlet debía hacerse con 6 horas, puesto que extender el tiempo de extracción no era sinónimo de mejores rendimientos. Contrario a lo que Lapornik et al. (2005) en su trabajo: *Comparación de extractos preparados a partir del orégano utilizando diferentes disolventes y tiempo de extracción*, mencionan que un mayor tiempo de extracción puede producir un mejor rendimiento. Dicho postulado no es acorde a los resultados de esta investigación, lo cual pudo ser causado por las condiciones en las cuales se trabajó, ya que el autor en su estudio empleó hexano y éter de petróleo, como solventes de la extracción. Sin embargo, en otro estudio denominado *Extracción Soxhlet para el análisis de aceites esenciales y compuestos volátiles de plantas* también se menciona que la integridad del analito puede verse afectada debido a las condiciones usadas durante la extracción, señala que prolongados tiempos de extracción pueden producir una descomposición térmica o pueden provocar que el analito reaccione con el solvente (Pourmortazavi & Hajimirsadeghi, 2007). Esta premisa se refuerza con lo mencionado por Jitan et al. (2018) que comentan que el método de extracción Soxhlet puede llegar a degradar al compuesto fenólico debido a su exposición a la luz y al oxígeno.

Según Rossi (2019) y Centeno-Bordones (2020), la exposición a la luz de compuestos extraídos de plantas aromáticas puede provocar: fotodegradación, es decir pérdida de sus propiedades; cambios en la concentración debido a la volatilidad; isomerización, es decir cambios en la posición de sus átomos; interacción con otros compuestos. En cuanto a la exposición al oxígeno Biswal & Pazhamali (2021) mencionan que puede ocurrir una reacción oxidativa. Estos factores pudieron comprometer el rendimiento del timol, puesto que las condiciones del laboratorio no permitieron que las extracciones se realizaran sin la presencia de luz solar y de oxígeno; además, no se pudo realizar la extracción de manera continua, como en el caso de la extracción Soxhlet de 12 horas que se realizó en dos jornadas de 6 horas cada una, debido al horario de trabajo del Centro de Estudios Ambientales (CEA).

La muestra fue almacenada en viales de color ámbar a una temperatura de 4 °C, siguiendo la metodología descrita por Węglarz et al. (2020). Esta metodología se basa en el hecho de que la luz y el oxígeno pueden causar el deterioro de las muestras biológicas. En donde recomienda usar viales de color ámbar para que el extracto no esté en contacto con la luz ultravioleta, y que pudiese degradar al timol. La temperatura de 4 °C ralentiza el metabolismo de las células de la muestra, lo que también ayuda a preservar su integridad.

En la Tabla 17, se expusieron los resultados del análisis estadístico para las extracciones con el método Soxhlet. Los promedios de los rendimientos de extracto de timol obtenidos con la muestra seca y fresca fueron: 11,95% y 8,77% p/p, respectivamente. Con lo que se determinó que entre una extracción con muestra seca y una extracción con muestra fresca no existía una diferencia estadísticamente significativa, lo cual puede atribuirse a la falta del control del tamaño de partícula de la materia vegetal. Según Campomanes & Chamorro (2009) las partículas más pequeñas presentan una mayor superficie de contacto, lo que significa que aumentan la transferencia de masa durante el proceso de extracción, así los componentes deseados pueden difundirse más fácilmente desde el material de partida hacia el solvente de extracción. No obstante, Chacón et al. (2010) mencionan que, en partículas muy finas, menores a 25  $\mu\text{m}$ , se observa un rendimiento muy bajo de aceite esencial, esto lo adjudican al grado de compactación debido al humedecimiento por el solvente, impidiendo el proceso de extracción, por lo tanto, sugiere que se evite moler en exceso el material. Otro factor que pudo perjudicar la extracción es el aplanamiento de la materia prima que se manifiesta cuando las hojas debidas a su peso tienden a comprimirse unas contra otras (Yilmaz & Erkmen, 2013). Con lo anterior mencionado, se determinó que la extracción con el método Soxhlet debe realizarse con muestra fresca, puesto que realizar el acondicionamiento de la muestra seca resultaría ser un proceso ineficiente, considerando que no será significativamente diferente del rendimiento que se puede obtener con la muestra fresca.

Para la extracción con arrastre de vapor se utilizó una masa de 60 g de orégano. Esto se debe a que Cáceres et al. (2021) afirman que la salida del vapor debe estar en contacto directo con la muestra para garantizar una correcta transferencia de masa. El matraz del equipo de extracción con arrastre de vapor con el que se trabajó tenía una capacidad de 1000 ml, así que fue necesario usar más cantidad de muestra para que la salida del vapor estuviera en contacto con toda la superficie de la muestra y no solo con la capa superficial. De esta manera, se evitó que el vapor se concentrara en una zona y no pudiera extraer el extracto de timol de manera uniforme.

El tiempo de extracción con arrastre de vapor se fijó en 1 hora, de acuerdo con el estudio *Optimización del rendimiento y contenido de timol de aceite esencial de orégano silvestre obtenido por arrastre con vapor* de Arango B. et al. (2012) donde encontraron que el tiempo de extracción no es una variable estadísticamente significativa, por lo que trabajar con tiempos superiores a 1 hora no es favorable, ya que aumenta el consumo energético. Este último resultado se corroboró mediante un análisis sensorial de los extractos obtenidos, donde se observó que, después de una hora de extracción, el líquido condensado no mostraba de manera evidente la presencia del aceite esencial, ni su aroma característico. La cantidad de

volumen a usar se escogió debido a que Barberena & Hernández (2020) en su investigación *Extracción de los aceites esenciales de Origanum vulgare L. Y Rosmarinus officinalis L. Para la pre formulación de una crema con propiedad cicatrizante en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica*, recomiendan trabajar con un volumen de 250 ml, para realizar la extracción de arrastre de vapor durante 1 hora y 60 gramos de muestra.

Por otra parte, en la Tabla 20 se expusieron los resultados obtenidos del análisis estadístico para la extracción con arrastre de vapor, y se encontró que sí existía una variación estadísticamente relevante entre los tipos de muestra. La media de los rendimientos de extracto de timol obtenidos con la muestra fresca y seca fueron: 0,029% y 0,019% p/p, respectivamente. Una posible causa de un rendimiento reducido en la extracción del extracto de timol con muestra seca podría ser el grado de compactación de la materia seca; en consecuencia, se determinó que la extracción con arrastre de vapor debe realizarse con muestra fresca. Esta decisión demuestra que el acondicionamiento de la materia prima fresca que se realizó según las metodologías de Sevillano et al. (2019) y Prats Payá (2022), acerca del lavado de la materia prima; escurrido a temperatura ambiente (18,5 °C) por una hora; cambió de posición para un escurrimiento uniforme; demostraron ser efectivos, según los resultados de rendimiento obtenidos.

En las Tablas 14 y 15, se exhibieron los rendimientos de extracto de timol obtenidos con dos métodos de extracción: Soxhlet y arrastre de vapor. Los resultados evidenciaron que el método Soxhlet fue más eficiente que el método de arrastre de vapor puesto que se obtuvieron mejores rendimientos. Los rendimientos del extracto de timol del presente estudio guardan consistencia con los datos reportados en el estudio *Extracción y actividades antioxidantes de dos especies de plantas de Origanum que contienen compuestos fenólicos y flavonoides* realizado por Benchikha et al. (2018), quienes lograron un rendimiento del 7,11 % p/p utilizando el método Soxhlet y un 0,17 % p/p mediante un proceso de arrastre de vapor de 2,5 horas. Kawase et al. (2017), en su estudio denominado *Cambios en el aceite esencial de Origanum vulgare L. afectados por diferentes métodos de extracción*, lograron un rendimiento del 0,45% p/p con 100 gramos de orégano mediante un proceso de arrastre de vapor de 2 horas de duración.

Es relevante destacar que en la Tabla 14 correspondiente a los rendimientos derivados del método Soxhlet. Se observó que los rendimientos de extracto de timol derivados de una extracción de 6 horas, utilizando muestra seca y una concentración de solventes de 70%:30% (etanol-agua destilada), alcanzaron el 25,84% p/p, siendo este el rendimiento máximo alcanzado por este estudio, este resultado coincide con las observaciones de Okonkwo &

Ohaeri (2020), quienes sostienen que el método Soxhlet es más eficiente que el arrastre de vapor para la obtención de extractos de una planta. Sin embargo, la discrepancia en los resultados sugiere que el elemento crítico podría residir en la variabilidad de la materia prima. La imposibilidad de controlar el manejo específico de las plantas de orégano durante su cultivo y cosecha, podrían haber introducido variaciones sustanciales en la composición de la muestra, impactando directamente en los rendimientos observados.

En comparación con el método Soxhlet, se observó que el método de extracción por arrastre de vapor obtuvo un rendimiento significativamente menor, alcanzando un valor máximo de 0,0305 % p/p con 60 gramos de hojas frescas de *Origanum vulgare L.* y una hora de extracción. Este bajo rendimiento puede atribuirse a diversos factores ya antes mencionados como: la baja solubilidad de timol en agua, la posible degradación de los componentes volátiles (timol) durante el proceso de extracción o el fenómeno de aplanamiento de la materia prima. A pesar del rendimiento inferior, es importante destacar que el método de arrastre de vapor presenta ventajas en términos de simplicidad y requerimientos de equipo, en comparación con el método Soxhlet, por lo tanto, la elección del método debe hacerse de acuerdo al analito que se desee extraer.

## Capítulo 5. Conclusiones

En este estudio se estableció que el factor crítico en la extracción Soxhlet fue la concentración de solventes 100%:0%, 85%:15% y 70%:30% etanol-agua destilada. El tiempo (6 y 12 horas) y el tipo de muestra (seca o fresca) no mostraron diferencias estadísticamente significativas. En consecuencia, se determinó que las condiciones ideales de extracción para el método Soxhlet eran: concentración de solventes 70%:30% etanol-agua destilada, 6 horas de extracción y muestra fresca de hojas de orégano.

En el arrastre de vapor, las hojas frescas presentaron una diferencia estadísticamente significativa superior con respecto a las hojas secas. Por consiguiente, se determinó que las condiciones ideales de extracción para el arrastre de vapor eran: muestra fresca de hojas de orégano y 1 hora de extracción.

La preparación y acondicionamiento de la muestra seca resultó ser más efectivo para el método de extracción Soxhlet, llegando a obtenerse un rendimiento medio de extracto de timol de 11,95% p/p; mientras que, la preparación y acondicionamiento de la muestra fresca resultó ser más eficaz para la extracción con arrastre de vapor, logrando alcanzar un rendimiento medio de extracto de timol de 0,029% p/p.

Se elaboraron curvas de calibración para la cuantificación de timol en extractos de orégano para los dos métodos de extracción. La calidad de las curvas de calibración se evaluó con el resultado de cada coeficiente de correlación. Para la curva de calibración de 100%:0% etanol-agua destilada, el coeficiente de correlación fue de  $R^2=0,99361$ . En el caso de las curvas de calibración de la mezcla de solventes 85%:15% etanol-agua destilada, el coeficiente de correlación más alto fue de  $R^2=0,99072$ . Por otro lado, con la mezcla de solventes 70%:30% etanol-agua destilada, el coeficiente de correlación más cercano a 1 fue de  $R^2=0,99118$ . En contraste, en las curvas generadas mediante arrastre de vapor, se alcanzó el coeficiente de correlación más alto, obteniendo un valor de  $R^2=0,99962$ . Estos resultados confirmaron que todas las curvas se ajustaron de manera efectiva al modelo lineal, lo que respalda la precisión de las cuantificaciones realizadas en el análisis de timol en los extractos de orégano.

En el método Soxhlet, las condiciones con las que se logró un rendimiento máximo de 25,84% p/p del extracto de timol fueron: concentración de solventes etanol-agua destilada 70%:30%, 10 g de muestra seca y 6 horas de extracción; mientras que, las mejores condiciones para la extracción con arrastre de vapor con las que se obtuvo un rendimiento máximo de 0,0305% p/p fueron 60 g de muestra fresca y 1 hora de extracción. Finalmente se concluyó que el método Soxhlet resultó ser más eficaz para la obtención de un extracto de timol.

### Recomendaciones

Se sugiere precaución durante el proceso de extracción Soxhlet para evitar la exposición de los extractos a la luz solar. Idealmente, las extracciones deben llevarse a cabo en una habitación aislada; sin embargo, en casos donde esto no sea factible, se puede mitigar la exposición cubriendo el equipo Soxhlet con papel aluminio.

Con el fin de prevenir la volatilización del timol en la solución madre o en los patrones destinados a la elaboración de curvas de calibración, se aconseja proteger los balones de aforo mediante el uso de papel aluminio. Estos deben abrirse únicamente en el momento preciso para la toma de alícuotas.

En la preparación de una solución diluida de timol en agua, se recomienda diluir primero el timol en etanol. Esto garantizará una adecuada mezcla con el agua, ya que, de lo contrario, el timol no se disolverá en el agua.

### Referencias

- Academia Nacional de Medicina. (2018, mayo 22). CV. Timol, tomillo y otras fuentes vegetales: Salud y usos potenciales. *Phytotherapy Research*, 22/05/2018 | Academia Nacional de Medicina. <https://academianacionaldemedicina.org/publicaciones/cv-timol-tomillo-y-otras-fuentes-vegetales-salud-y-usos-potenciales-phytotherapy-research-22-05-2018/>
- Acevedo, D., Navarro, M., & Monroy, L. (2013). Composición Química del Aceite Esencial de Hojas de Orégano (*Origanum vulgare*). *Información tecnológica*, 24(4), 43-48. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642013000400005>
- Akter, M. A., Khan, M. S., & Rahman, M. M. (2022). Biodegradation of ethanol and its effect on soil quality. *Journal of Environmental Science and Health Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Environmental Toxicology*, 57(8), 851–860.
- Angulo, A. M., Karime Andrea Montañez, & Andrés Felipe Salcedo Osorio. (2012). Introducción a la industria de los aceites esenciales extraídos de las plantas medicinales y aromáticas. [https://repositorio.sena.edu.co/sitios/introduccion\\_industria\\_aceites\\_esenciales\\_plantas\\_medicinales\\_aromaticas/#](https://repositorio.sena.edu.co/sitios/introduccion_industria_aceites_esenciales_plantas_medicinales_aromaticas/#)
- Aparicio, C. S. A. (2021). Microencapsulación del aceite esencial de salvia sagittata (salvia azul) por spray chilling, para asegurar su capacidad antimicrobiana, analgésica y antiinflamatoria.
- Arango B, O., Bolaños, F., Villota, O., Hurtado B, A., & Toro, I. (2012). Optimización del rendimiento y contenido de timol de aceite esencial de orégano silvestre obtenido por arrastre con vapor. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 10(2), 217-226.
- Arango, O., Hurtado, A., Castillo, P., & Santacruz, M. (2009). Estudio de las condiciones de extracción por arrastre con vapor del aceite esencial de laurel de cera (*Morella pubescens*). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 7(2), 40-48.
- Arcila-Lozano, C. C., Loarca-Piña, G., Lecona-Urbe, S., & González de Mejía, E. (2012). El orégano: Propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(1), 100-111.

- Arciniegas Cabrera, V. (2020). Recuperación de compuestos bioactivos de subproductos de la industria alimentaria mediante el empleo de mezclas etanol/aguas presurizadas. <https://riubu.ubu.es/handle/10259/5611>
- Ashenhurst, J. (2022). Planning organic synthesis with “Reaction maps” Master Organic Chemistry. <https://www.masterorganicchemistry.com/2013/12/17/introduction-to-synthesis/>
- Aziz, Z. A. A., Ahmad, A., Setapar, S. H. M., Karaküçük, A., Azim, M. M., Lokhat, D., Rafatullah, M., Ganash, M., Kamal, M. A., & Ashraf, G. M. (2018). Essential oils: Extraction techniques, pharmaceutical and therapeutic potential - a review. *Current Drug Metabolism*, 19(13), 1100-1110. <https://doi.org/10.2174/1389200219666180723144850>
- Barberena, D., & Hernández, J. (2020). Extracción de los aceites esenciales de *Origanum vulgare* L. Y *Rosmarinus officinalis* L. Para la pre formulación de una crema con propiedad cicatrizante en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica, Departamento de Química.
- Benchikha, N., Menaceur, M., & Barhi, Z. (2017). Extraction and antioxidant activities of two species *Origanum* plant containing phenolic and flavonoid compounds. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 5(1), 120. <https://doi.org/10.4314/jfas.v5i1.10>
- Biswal, R. A., & Pazhamalai, V. (2021). Thymol. En *Elsevier eBooks* (pp. 275-290). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-822923-1.00015-7>
- Bogdan, S., Cecilia, D., & Roberto, R. (2015). Evaluación de timol para el control antifúngicosobre películas de pintura. *Matéria* (Rio de Janeiro), 20, 699-704. <https://doi.org/10.1590/S1517-707620150003.0073>
- Cáceres, M. B., Rozo, V. F., & García, E. del V. (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 de la Facultad de Ciencias Agrarias*. [https://www.fca.unju.edu.ar/media/revista\\_articulo/RC2021\\_Caceres\\_Roso\\_Garcia.pdf](https://www.fca.unju.edu.ar/media/revista_articulo/RC2021_Caceres_Roso_Garcia.pdf)
- Caldas, A. (2012). *Optimización, escalamiento y diseño de una planta piloto de extracción sólido líquido*. Universidad de Cuenca.



- Campomanes, Á. M. F., & Chamorro, R. A. M. (2009). Influencia de la Temperatura y Tamaño de Partícula en el Proceso de Extracción de Aceite de Semilla de uva (*Vitis vinífera*). *Revista de Investigación Universitaria*, 1(1), Article 1. <https://doi.org/10.17162/riu.v1i1.9>
- Caputo, L., Amato, G., De Bartolomeis, P., Martino, L., Manna, F., Nazzaro, F., De Feo, V., & Barba, A. A. (2022). Impact of drying methods on the yield and chemistry of *Origanum vulgare* L. essential oil. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07841-w>
- Carhuallanqui, A., Salazar, M. E., & Ramos, D. (2020). Efecto antimicrobiano del aceite esencial de Orégano frente a *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 22, 321–329. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1976.sp011633>
- Casado, I. (2018). *Optimización de la extracción de aceites esenciales por destilación en corriente de vapor*. Universidad Politécnica de Madrid.
- Cavallaro, V., Murray, A. P., & Ferreira, M. L. (2023). Innovative and eco-friendly methods and pretreatments for essential oil extraction: An update. En *Studies in natural products chemistry* (pp. 481-518). <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-91253-2.00002-9>
- Centeno-Bordones, G. (2020). *Degradación de fenol e identificación por HPLC de los productos generados utilizando lodo rojo como catalizador en procesos de oxidación avanzada solar*. <https://www.redalyc.org/journal/707/70764230004/html/>
- Chacón Pagan, T., Gonzales-Mora, H. E., & Cueva-Gálvez, G. E. (2010). Características del aceite esencial de la madera de «palo rosa» (*aniba rosaeodora ducke*), obtenido mediante destilación. *Folia Amazónica*, 15(1-2), Article 1-2. <https://doi.org/10.24841/fa.v15i1-2.197>
- Chan, K. S., & Tan, J. (2015). Planning for organic synthesis. En *Understanding Experimental Planning for Advanced Level Chemistry* (1.a ed.). [https://doi.org/10.1142/9789814667913\\_0009](https://doi.org/10.1142/9789814667913_0009)
- Chittratan, P., Chalitangkoon, J., Wongsariya, K., Mathaweensurn, A., Detsri, E., & Monvisade, P. (2022). New Chitosan-Grafted Thymol coated on gold nanoparticles for control of cariogenic bacteria in the oral cavity. *ACS omega*, 7(30), 26582-26590. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c02776>

- Corella, R. A., & Ortega, M. M. (2013). Importancia del aceite esencial y la producción de orégano *Lippia palmeri* Watson en el estado de Sonora. *Biocencia*, 15(1), Article 1. <https://doi.org/10.18633/bt.v15i1.137>
- Escobar, A., Pérez, M., Romanelli, G., & Blustein, G. (2020). Thymol bioactivity: A review focusing on practical applications. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(12), 9243-9269. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.11.009>
- Esquivel F., A., & Vargas Aguilar, P. (2007). Uso de aceites esenciales extraídos por medio de fluidos supercríticos para la elaboración de alimentos funcionales. *Tecnología en Marcha*, 20(4), 7.
- Fadhil, G. (2014). Spectrophotometric determination of thymol in pharmaceutical preparations via oxidative coupling reaction with 2, 4-dinitrophenylhydrazine in the presence of potassium periodate. *Iraqi J. Sci*, 55(1), 27-34.
- Fajardo Contreras, J. D., Sánchez Plaza, F. A., Dueñas Rivadeneira, J. P., Dueñas Rivadeneira, A. A., Fajardo Contreras, J. D., Sánchez Plaza, F. A., Dueñas Rivadeneira, J. P., & Dueñas Rivadeneira, A. A. (2022). Extracción asistida por ultrasonido y su aplicación en la obtención de aceites vegetales. *Centro Azúcar*, 49(4), 125-143.
- FAO. (2022). El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo 2022. FAO; IFAD; WHO; WFP; UNICEF; <https://doi.org/10.4060/cc0639es>
- Fooddata Central. (2019, enero 4). <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/171328/nutrients>
- Frías-Zepeda, M. E., & Rosales-Castro, M. (2021). Efecto de las condiciones de extracción sobre la concentración de compuestos fenólicos en residuos de orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth). *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 27(3), Article 3. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2020.10.066>
- Fukalova, T. F., Brito, G. B., Novoa, C., Sagñay, T. E., Samaniego, M. I., Tacan, P. M., & Tapia, C. (2021). Análisis comparativo de las propiedades fisicoquímicas y capacidad antioxidante de un morfotipo de orégano (*Origanum vulgare* L.) cultivado en dos localidades de la sierra ecuatoriana. *Siembra*, 8(1). <https://doi.org/10.29166/siembra.v8i1.2289>

- Gallego Iradi, M. G., & Almajano Pablos, M. P. (2016). Estudio de la actividad antioxidante de diversas plantas aromáticas y/o comestibles [Universitat Politècnica de Catalunya]. <https://doi.org/10.5821/dissertation-2117-105811>
- Ganesh, K. N., Zhang, D., Miller, S. J., Rossen, K., Chirik, P. J., Kozlowski, M. C., Zimmerman, J., Brooks, B. W., Savage, P. E., Allen, D. T., & Voutchkova-Kostal, A. (2021). Green Chemistry: a framework for a sustainable future. *Organic Process Research & Development*, 25(7), 1455-1459. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.1c00216>
- García Jara, J. T. (2017). Extracción de aceite esencial por fluidos supercríticos y arrastre con vapor de cedrón (*aloesia triphylla*) en la región Arequipa. <http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/3413>
- García, E., Fernando Francisco, C.-Á., Gutiérrez-Urbe, J. A., & García-Lara, S. (2012). Revisión de la producción, composición fitoquímica y propiedades nutraceuticas del orégano mexicano. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 3(2), 339-353.
- García, M. M. (2016). *Apuntes para Espectrometría de Radiación Ultravioleta Visibles (UV/VIS)*.
- Gimeno Creus, E. (2004). Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la
- González-Torres, J. L., Pérez-Hernández, M. M., & Martínez-Gómez, A. (2020). Estudio de la solubilidad del timol en diferentes solventes. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 59(2), 287-295. *salud. Offarm*, 23(6), 80-84.
- Gullón, B., Gullón, P., Lú-Chau, T. A., Moreira, M. T., Lema, J. M., & Eibes, G. (2017). Optimization of solvent extraction of antioxidants from *Eucalyptus globulus* leaves by response surface methodology: Characterization and assessment of their bioactive properties. *Industrial Crops and Products*, 108, 649–659. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.07.014>
- Habtemariam, S. (2016). The Therapeutic Potential of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) Diterpenes for Alzheimer's Disease. <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2016/2680409/>
- Han, F., Ma, G., Yang, M., Li, Y., Xiong, W., Shu, J., Zhao, Z., & Xu, H. (2017). Chemical composition and antioxidant activities of essential oils from different parts of the oregano. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 18(1), 79–84. <https://doi.org/10.1631/jzus.b1600377>

Harvey, D. (2023). *Química analítica*. Pearson Education.

Hawthorne, S. B., C. B. Grabanski, E. Martin, AND D. J. Miller. Comparisons of soxhlet extraction, pressurized liquid extraction, supercritical fluid extraction, and subcritical water extraction for environmental solids: recovery, selectivity, and effects on sample matrix. (r825394). *Journal of chromatography A*. Elsevier Science Ltd, New York, NY, 892(1-2):421-433, (2000).

Ichim, T. & Blaga, A. C. (2021). Extraction methods of capsaicin.

Inmaculada Angurell, Núria Casamitjana, Amparo Caubet, Inmaculada Dinares, Nuria Llor, Diego Muñoz Torrero, Ernesto Nicolas, M. Lluisa Pérez García, M. Dolors Pujol, Glòria Rosell, Miquel Seco, & Dolors Velasco. (2016). *Operaciones Básicas en el Laboratorio de Química. Destilación. Tipos de Destilación*.  
[https://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/destilacio\\_tipus.html#vapor](https://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/destilacio_tipus.html#vapor)

Jiang, X., Wang, Y., & Li, M. (2014). Selecting water-alcohol mixed solvent for synthesis of polydopamine nano-spheres using solubility parameter. *Scientific Reports*, 4(1).  
<https://doi.org/10.1038/srep06070>

Jitan, S. A., Alkhoori, S. A., & Yousef, L. F. (2018). Phenolic compounds from plants: Extraction and application to human health. En *Studies in natural products chemistry* (pp. 389-417).

Joshi, D. R., & Adhikari, N. (2019). An Overview on Common Organic Solvents and Their Toxicity. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 1-18.  
<https://doi.org/10.9734/jpri/2019/v28i330203>

Kawase, K., Mothé, C. G., Furtado, F. A., & Coelho, G. (2013). Changes in essential oil of *Origanum vulgare* L. affected by different extraction methods. *Int. J. Recent Res. Appl. Stud*, 14, 238.

Kawase, K., Mothé, C. G., Furtado, F. A., & Coelho, G. (2013). Changes in essential oil of *Origanum vulgare* L. Affected by different extraction methods. *Int. J. Recent Res. Appl. Stud*, 14, 238.

Kharissova, O. V., Kharissov, B. I., González, C. M. O., Méndez, Y. P., & López, I. (2019). Greener synthesis of chemical compounds and materials. *Royal Society Open Science*, 6(11), 191378. <https://doi.org/10.1098/rsos.191378>

- Kosakowska, O., Węglarz, Z., Pióro-Jabrucka, E., Przybył, J. L., Kraśniewska, K., Gniewosz, M., & Bączek, K. (2021). Antioxidant and Antibacterial Activity of Essential Oils and Hydroethanolic Extracts of Greek Oregano (*O. Vulgare* L. Subsp. *Hirtum* (Link) *letsvaart*) and Common Oregano (*O. Vulgare* L. Subsp. *Vulgare*). *Molecules*, 26(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/molecules26040988>
- Kowalczyk, A., Przychodna, M., Sopata, S., Bodalska, A., & Fecka, I. (2020). Thymol and Thyme Essential Oil—New Insights into Selected Therapeutic Applications. *Molecules*, 25(18), 4125. <https://doi.org/10.3390/molecules25184125>
- Kumar, S., Bhandari, C. S., Sharma, P., & Agnihotri, N. (2018). Role of piperine in chemoresistance. En *Elsevier ebooks* (pp. 259-286). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812373-7.00013-9>
- Lapornik, M. Prosek, A.G. Wondra. (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *J. Food Eng.* 71, 214- 222
- Laurlund, C. I. (2021). Caracterización agroclimática de tres materiales de Orégano (*Origanum* sp.) Bajo riego en el sur de la provincia de Buenos Aires. <https://repositoriodigital.uns.edu.ar/handle/123456789/5807>
- Leyva-López, N., Gutiérrez-Grijalva, E. P., Vazquez-Olivo, G., & Heredia, J. B. (2017). Essential Oils of Oregano: Biological Activity beyond Their Antimicrobial Properties. *Molecules*, 22(6), 989. <https://doi.org/10.3390/molecules22060989>
- Li, C., & Trost, B. M. (2008). Green chemistry for chemical synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(36), 13197-13202. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804348105>
- Liu, A., & Yalkowsky, S. H. (1994). Solubility of organic solutes in Ethanol/Water mixtures. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83(12), 1735-1740. <https://doi.org/10.1002/jps.2600831217>
- Loong, K., Wahida, P. F., & Chong, C. H. (2014). Optimisation of extraction of thymol from *Plectranthus amboinicus* leaves using response surface methodology.
- López-Bascón, M. A., & De Castro, M. D. L. (2020). Soxhlet Extraction. En *Elsevier eBooks* (pp. 327-354). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816911-7.00011-6>

- López-Muñoz, A., García-López, L., García-Alonso, A., & Sánchez-Rabanal, M. (2018). Extraction and purification of thymol from lavender essential oil by Soxhlet extraction and preparative chromatography. *Journal of Essential Oil Research*, 30(2), 154-160.
- Maldonado, M., Guzmán, G., & Ramírez, Y. (2022). Selección de un método de calibración en espectroscopía UV para la cuantificación de ivermectina.
- Marchetti, P., Jimenez Solomon, M. F., Szekely, G., & Livingston, A. G. (2014). Molecular Separation with Organic Solvent Nanofiltration: A Critical Review. *Chemical Reviews*, 114(21), 10735-10806. <https://doi.org/10.1021/cr500006j>
- Modareskia, M., Fattahi, M., & Mirjalili, M. H. (2022). Thymol screening, phenolic contents, antioxidant and antibacterial activities of Iranian populations of *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague (Apiaceae). *Scientific Reports*, 12(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19594-7>
- Mohd-Setapar, S. H., Nian-Yian, L., & Mohd-Sharif, N. (2014). Extraction of hevea brasiliensis oil using soxhlet method. *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 10(1). <https://doi.org/10.11113/mjfas.v10n1.61>
- Montgomery, D. C., & Runger, G. C. (2010). *Applied statistics and probability for engineers*. John Wiley & sons.
- Mora, A. E., Treviño-Garza, M. Z., Amaya Guerra, C. A., Galindo Rodríguez, S. A., Castillo, S., Martínez-Rojas, E., Rodríguez-Rodríguez, J., & Báez-González, J. G. (2022). Comparison of Chemical Composition, Physicochemical Parameters, and Antioxidant and Antibacterial Activity of the Essential Oil of Cultivated and Wild Mexican Oregano *Poliomintha longiflora* Gray. *Plants*, 11(14), Article 14. <https://doi.org/10.3390/plants11141785>
- Mukurumbira, A. R., Shellie, R. A., Keast, R., Palombo, E. A., Muir, B. W., & Jadhav, S. R. (2023). The antimicrobial efficacy of native Australian essential oils in liquid and vapour phase against foodborne pathogens and spoilage microorganisms. *Food Control*, 151, 109774. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109774>
- Muñoz, W., Chavez, W., Pabón, L. C., Rendón, M., Chaparro, M. P., & Otálvaro, Á. (2015). Extracción de compuestos fenólicos con actividad antioxidante a partir de orégano. (*Campomanesia lineatifolia*). <https://revista.cnic.cu/index.php/revquim/article/view/138/138>

- Nicolaou, K. C. (2014). Organic synthesis: the art and science of replicating the molecules of living nature and creating others like them in the laboratory. *Proceedings of The Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 470(2163), 20130690. <https://doi.org/10.1098/rspa.2013.0690>
- Nicolaou, K. C. (2018). The emergence and evolution of organic synthesis and why it is important to sustain it as an advancing art and science for its own sake. *Israel Journal of Chemistry*, 58(1-2), 104-113. <https://doi.org/10.1002/ijch.201700121>
- Ninkuu, V., Zhang, L., Yan, J., Fu, Z., Yang, T., & Zeng, H. (2021). Biochemistry of Terpenes and Recent Advances in Plant Protection. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/ijms22115710>
- Novoa, P. (2019). Evaluación de la composición química y capacidad antioxidante de la planta de orégano (*Origanum vulgare* L.).
- Olaya Flórez, J. M. (2003). Guía de plantas y productos medicinales. Convenio Andrés Bello.
- Ortega-Nieblas, M. M., Robles-Burgueño, M. R., Acedo-Félix, E., González-León, A., Morales-Trejo, A., & Vázquez-Moreno, L. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of oregano (*Lippia palmeri* S. Wats) essential oil. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 34(1), 11-17.
- Paredes, M. de la C., Gastélum, M. G., Silva, R., & Nevárez, G. V. (2007). Efecto antimicrobiano del orégano mexicano (*lippia berlandieri* Schauer) y de su aceite esencial sobre cinco especies del género *vibrio*. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30.
- Patel, N. R., & Shah, S. R. (2015). Biodiesel from plant oils. En Elsevier ebooks (pp. 277-307). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800211-7.00011-9>
- Pérez, E., & Almazán, V. (2015). *Síntesis de nanopartículas de plata y estudio de la estabilidad temporal de sus propiedades ópticas*. Centro de Investigación en Materiales Avanzados, S.C.
- Pérez, G. (2016). Espectrometría de absorción. *Espectrometria.com*. Recuperado 27 de septiembre de 2023
- Pérez, L. M. C. (2020). Determinación de la capacidad antioxidante de plantas aromáticas.

- Pino, J. (2015). *Aceites esenciales: química, bioquímica, producción y usos*. Editorial Universitaria.
- Plaskova, A., & Mlcek, J. (2023). New insights of the application of water or ethanol-water plant extract rich in active compounds in food. *Frontiers in Nutrition*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2023.1118761>
- Pourmortazavi, S.S. Hajimirsadeghi, Soxhlet extraction for the analysis of essential oils and volatile plant compounds., *J. Chrom. A* 1163, 2-24 (2007).
- Prats Payá, J. (2022). Estudio técnico y económico de extracción de aceite esencial de romero (*Salvia Rosmarinus*) mediante destilación de arrastre con vapor. Universitat Politècnica de València.
- Proestos, C.; Chorianopoulos, N.; Nychas, G. And Komaitis, N. 2005. RP-HPLC Analysis of the phenolic compounds of plant Extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* 53:1190-1995.
- Radulov, P. S., Yaremenko, I. A., Keiser, J., & Terent'ev, A. O. (2023). Bridged 1,2,4-Trioxolanes: SNCL4—Catalyzed synthesis and an in vitro study against *S. Mansoni*. *Molecules*, 28(13), 4913. <https://doi.org/10.3390/molecules28134913>
- Raja, M. V., & Barron, R. (2022). 4.4: UV-Visible spectroscopy. Chemistry libretexts. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical\\_Chemistry/Physical\\_Methods\\_in\\_Chemistry\\_and\\_Nano\\_Science\\_\(Barron\)/04%3A\\_Chemical\\_Speciation/4.04%3A\\_UV-Visible\\_Spectroscopy](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Physical_Methods_in_Chemistry_and_Nano_Science_(Barron)/04%3A_Chemical_Speciation/4.04%3A_UV-Visible_Spectroscopy)
- Ranjbar, A., Ramezani, A., Shekarforoush, S. S., Niakosari, M., & Eshghi, S. (2022). Antifungal activity of thymol against the main fungi causing pomegranate fruit rot by suppressing the activity of cell wall degrading enzymes. *LWT*, 161, 113303. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113303>
- Rayess, Y. E., Dawra, M., & Beyrouthy, M. E. (2022). Modern extraction techniques for herbal bioactives. En *Elsevier eBooks* (pp. 437-455). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-824385-5.00002-9>
- Redfern, J., Kinninmonth, M., Burdass, D., & Verran, J. (2014). Using Soxhlet ethanol extraction to produce and test plant material (Essential oils) for their antimicrobial



properties. *Journal of Microbiology & Biology Education*, 15(1), 45-46.  
<https://doi.org/10.1128/jmbe.v15i1.656>

- Requejo, A. (2020). *Aceites esenciales en Sinergia*. ExLibric.
- Ricciardi, P., De Bellis, A., & Di Giacomo, A. (2014). Composition of the essential oils from leaves, stems, and roots of *Origanum vulgare* from southern Italy. *Journal of Essential Oil Research*, 24(5), 355-360.
- Rivas Pérez, B. N., Leal Granadillo, I. A., Loaiza Cuauero, L. F., Morillo, Y. E., & Colina Chirinos, J. C. (2017). Phenolic Compounds and antioxidant activity in extracts of four Oregano species. *Revista Técnica*, 40(3), 134–142.  
[https://ve.scielo.org/scielo.php?lng=en&nrm=iso&pid=S0254-07702017000300002&script=sci\\_abstract](https://ve.scielo.org/scielo.php?lng=en&nrm=iso&pid=S0254-07702017000300002&script=sci_abstract)
- Rodrigues, V. H., De Melo, M. M., Tenberg, V., Carreira, R., Portugal, I., & Silva, C. M. (2021). Similarity analysis of essential oils and oleoresins of *Eucalyptus globulus* leaves produced by distinct methods, solvents and operating conditions. *Industrial Crops and Products*, 164, 113339. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113339>
- Rodríguez, M. I. (2017). *Estudio de los parámetros fisicoquímicos de los complejos de timol, carvacrol y linalol en ciclodextrinas y evaluación del efecto de la complejación en su actividad antimicrobiana*. Universidad Católica de Murcia.
- Rodríguez, M., Alcaraz, L., & Real, S. (2012). *Procedimientos para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas* (1.ª ed.). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Samadi, M., Abidin, Z. Z., Yoshida, H., Yunus, R. M., & Biak, D. R. A. (2020). Towards higher oil yield and quality of essential oil extracted from *Aquilaria malaccensis* wood via the subcritical technique. *Molecules*, 25(17), 3872.  
<https://doi.org/10.3390/molecules25173872>
- Sánchez, M., Rodríguez-Calvo, P., & López-Miranda, J. M. (2016). Comparative study of the efficiency of different solvents for the extraction of essential oils from thyme. *Journal of Essential Oil Research*, 28(4), 458–463.
- Sánchez, Y. (2009). Métodos de aislamiento de aceites esenciales en bases especiadas. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 19(3).
- Sanz Tejedor, A. (2016). *Química Orgánica Industrial*.  
<https://www.eii.uva.es/organica/qoi/tema-10.php>

- Schaub, T. (2021). Efficient industrial organic synthesis and the principles of green chemistry. *Chemistry: A European Journal*, 27(6), 1865-1869. <https://doi.org/10.1002/chem.202003544>
- Schreiber, S. L. (2011). Organic synthesis toward small-molecule probes and drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(17), 6699-6702. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103205108>
- Sevillano, R., Siche, R., Castillo, W., & Silva, E. (2019). Optimización de la extracción por arrastre de vapor de aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) utilizando diseños secuenciales. *Manglar*, 16(1), Article 1.
- Shcherbakova, L., Mikityuk, O., Arslanova, L., Stakheev, A., Erokhin, D., Zavriev, S., & Dzhavakhiya, V. (2021). Studying the ability of thymol to improve fungicidal effects of tebuconazole and difenoconazole against some plant pathogenic fungi in seed or foliar treatments. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.629429>
- solvents and extraction time, *J. Food Eng.* 71, 214- 222 (2005)
- Suárez, D. (2013). Cadena agroalimentaria del orégano y otras aromáticas en el Valle de Traslasierra. Lineamientos estratégicos para su desarrollo competitivo (Provincia de Córdoba)—CORE. <https://core.ac.uk/works/83912185>
- Téllez, L., Arévalo, F., Juárez, H., Altamirano, P., Ccapa, K., Chávez, J., & Visitación, L. (2014). Determinación de timol y carvacrol en hojas de orégano por HPLC FL. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 80(4), 279-286.
- Tom, J. (2023). UV-VIS Spectroscopy: principle, strengths and limitations and applications. *Analysis & Separations from Technology Networks*. <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/uv-vis-spectroscopy-principle-strengths-and-limitations-and-applications-349865>
- Tongnuanchan, P., & Benjakul, S. (2014). Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of Food Science*, 79(7). <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12492>
- Torres, R. (2018). Evaluación del efecto antioxidante y antiinflamatorio del aceite esencial y compuestos terpénicos de nurite (*Satureja macrostema*). [http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/bitstream/handle/DGB\\_UMICH/3782/IIQB-D-2018-0275.pdf?Sequence=1&isallowed=y](http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/bitstream/handle/DGB_UMICH/3782/IIQB-D-2018-0275.pdf?Sequence=1&isallowed=y)

- Uribe Meza, K. Y. (2022). Efecto de los parámetros fisicoquímicos en la extracción y la cuantificación de betalaínas de la quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) Variedad INIA 420-Negra Collana por el método Soxhlet.
- UTPL. (2021). Fluidos supercríticos: La solución para crear productos ecoamigables | Blog. <https://noticias.utpl.edu.ec/fluidos-supercriticos-la-solucion-para-crear-productos-ecoamigables>
- Vanegas, P. (2016). Obtención de aceite esencial de semilla de durazno por método soxhlet y arrastre de vapor. <http://repository.uamerica.edu.co/handle/20.500.11839/7713>
- Varma, R. S. (2016). Greener and sustainable trends in synthesis of organics and nanomaterials. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4(11), 5866-5878. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b01623>
- Velásquez Valderrama, Á. M. (2012). La tecnología de fluidos supercríticos, un proceso limpio para el sector industrial. [Http://repository.unilasallista.edu.co/dspace//handle/10567/276](http://repository.unilasallista.edu.co/dspace//handle/10567/276)
- Vera Zambrano, J. F., & Zambrano Loor, J. I. (2017). Extracción de aceite esencial de orégano. 2017.
- Villamizar-Véliz, M., & Aular, Y. (2022). Métodos de extracción del aceite esencial de lippia alba. *Revista Ingeniería UC*, 29(1), Article 1. <https://doi.org/10.54139/revinguc.v29i1.90>
- Villavicencio Gastelú, J. E. (2017). Efecto antimicótico in vitro del orégano (*Origanum vulgare*) en cepas de *Candida albicans* procedentes de la Estomatitis Sub Protésica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/8171>
- Vogel, H., Muñoz, & Razmilic, I. (2011). *Efecto de la época de cosecha sobre el rendimiento de producto deshidratado y de aceite esencial en hoja de orégano (Origanum vulgare L.)*. Universidad de Talca.
- Walpole, R. E., Myers, R. H., Myers, S. L., & Ye, K. (2017). Probability and statistics for engineers and scientists. Pearson Education Limited.
- Waszkowiak, K., & Gliszczynska-Świgło, A. (2015). Binary ethanol–water solvents affect phenolic profile and antioxidant capacity of flaxseed extracts. *European Food*

Research and Technology, 242(5), 777-786. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2585-9>

Węglarz, Z., Kosakowska, O., Przybył, J. L., Pióro-Jabrucka, E., & Bączek, K. (2020). The quality of Greek oregano (*O. Vulgare* L. Subsp. *Hirtum* (Link) ietswaart) and common oregano (*O. Vulgare* L. Subsp. *Vulgare*) cultivated in the temperate climate of central Europe. *Foods*, 9(11), 1671.

Weng, S. (2017). *Preparación de nanopartículas de ácido poliláctico para la encapsulación de timol como agente bioactivo. Caracterización y optimización*. Universidad de Oviedo.

Xu, Y., Chen, L., Zhang, Y., Huang, Y., Cao, J., & Jiang, W. (2023). Antimicrobial and controlled release properties of nanocomposite film containing thymol and carvacrol loaded uio-66-NH<sub>2</sub> for active food packaging. *Food Chemistry*, 404, 134427. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134427>

Yilmaz, S., & Erkmen, T. (2013). Optimization of hydrodistillation conditions for the extraction of essential oil from oregano (*Origanum vulgare* L.). *Journal of Essential Oil Research*, 25(6), 507-512.

Yue, K., Zhou, Q., Bird, R. E., Zhu, L., Zhang, D., Li, D., Zou, L., Yang, J., Fu, X., & Georges, G. P. (2023). Trends and Opportunities in Organic Synthesis: Global state of research metrics and advances in precision, efficiency, and green chemistry. *Journal of Organic Chemistry*, 88(7), 4031-4035. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.2c03057>

Zambrano-Intriago, L. F., Buenaño-Allauca, M. P., Mancera-Rodríguez, N. J., & Jiménez-Romero, E. (2015). Estudio etnobotánico de plantas medicinales utilizadas por los habitantes del área rural de la Parroquia San Carlos, Quevedo, Ecuador. *Universidad y Salud*, 17(1), 97-111.

## Anexos

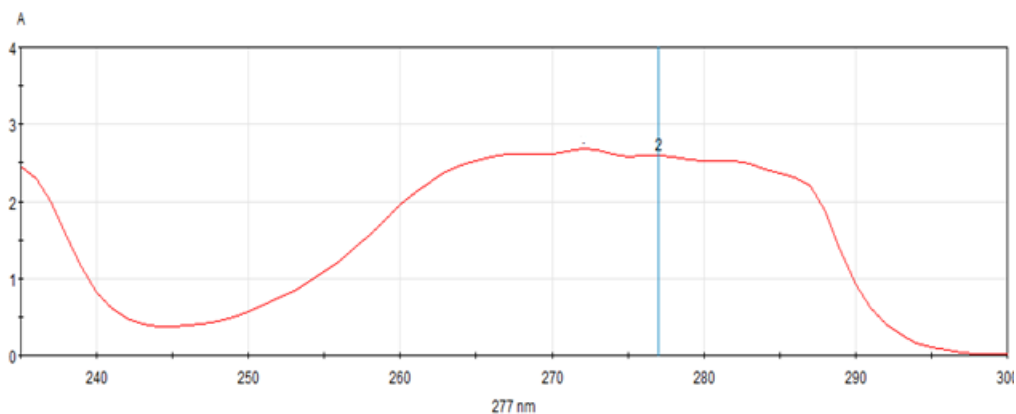
*Anexo A. Equipo de extracción Soxhlet*



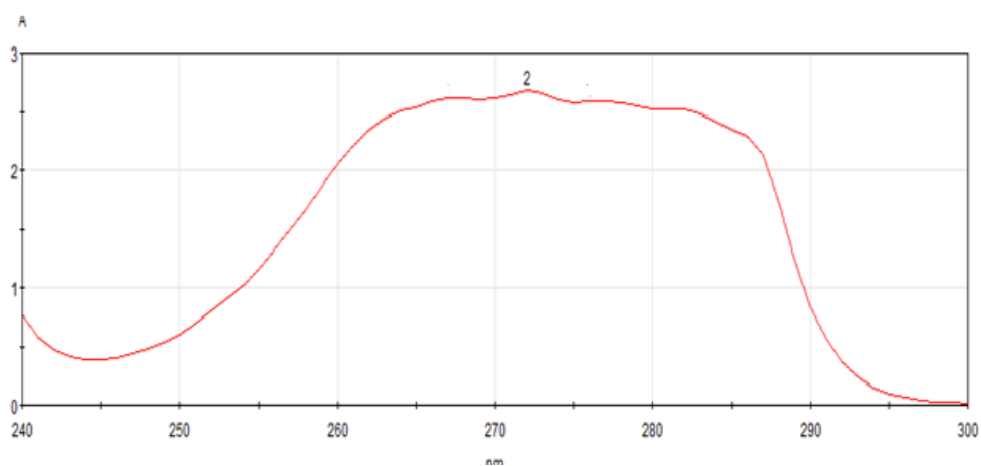
*Anexo B. Equipo de extracción por arrastre de vapor*



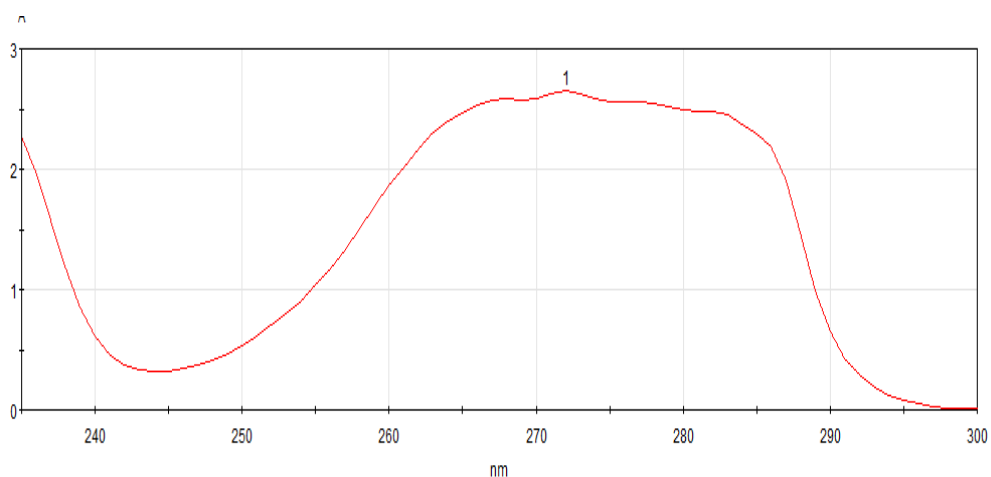
Anexo C. Espectro de absorción del timol obtenido para la concentración 100% etanol



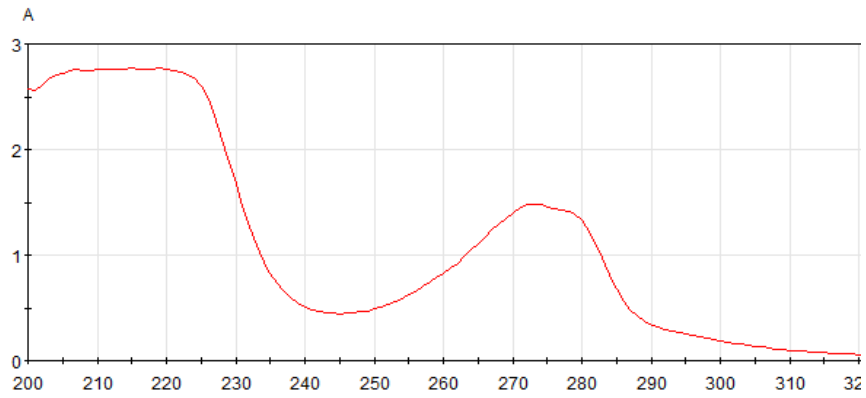
Anexo D. Espectro de absorción del timol obtenido para la curva de calibración 85% etanol



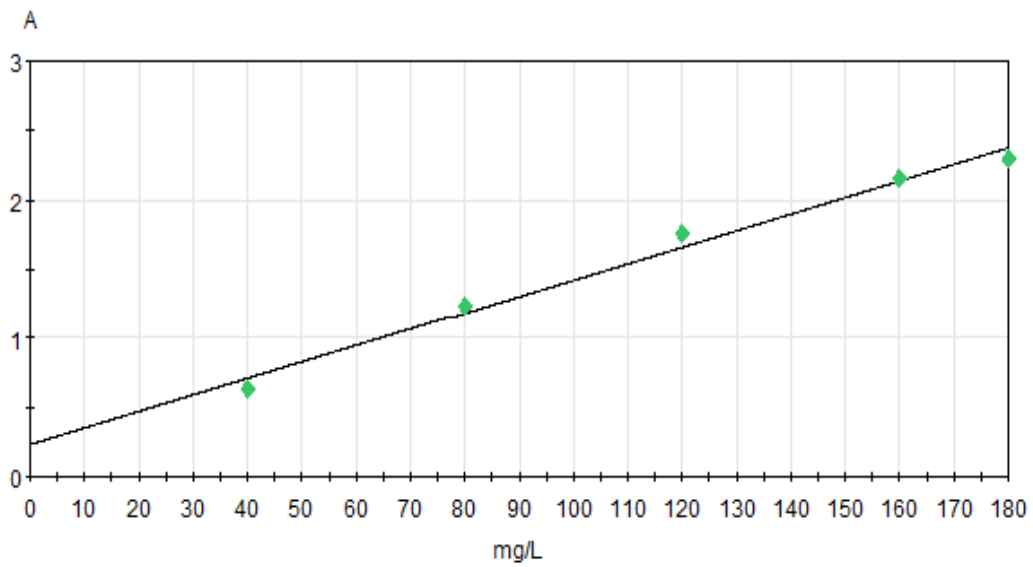
Anexo E. Espectro de absorción del timol obtenido para la concentración 70% etanol



Anexo F. Espectro de absorción del timol obtenido para el arrastre de vapor

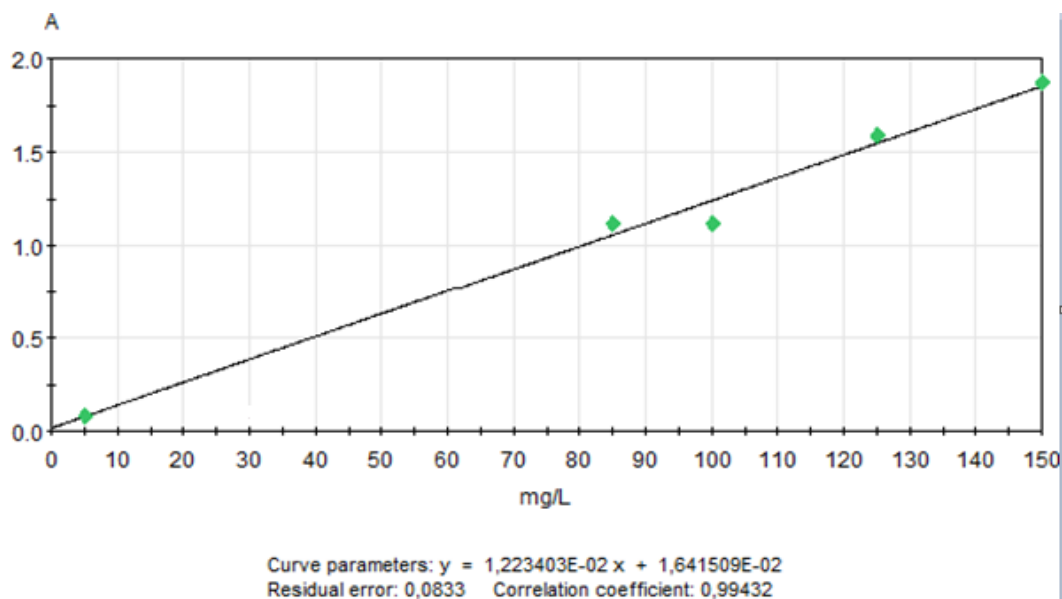


Anexo G. Curva de calibración para una concentración de solventes 100:0 etanol-agua destilada (método Soxhlet)

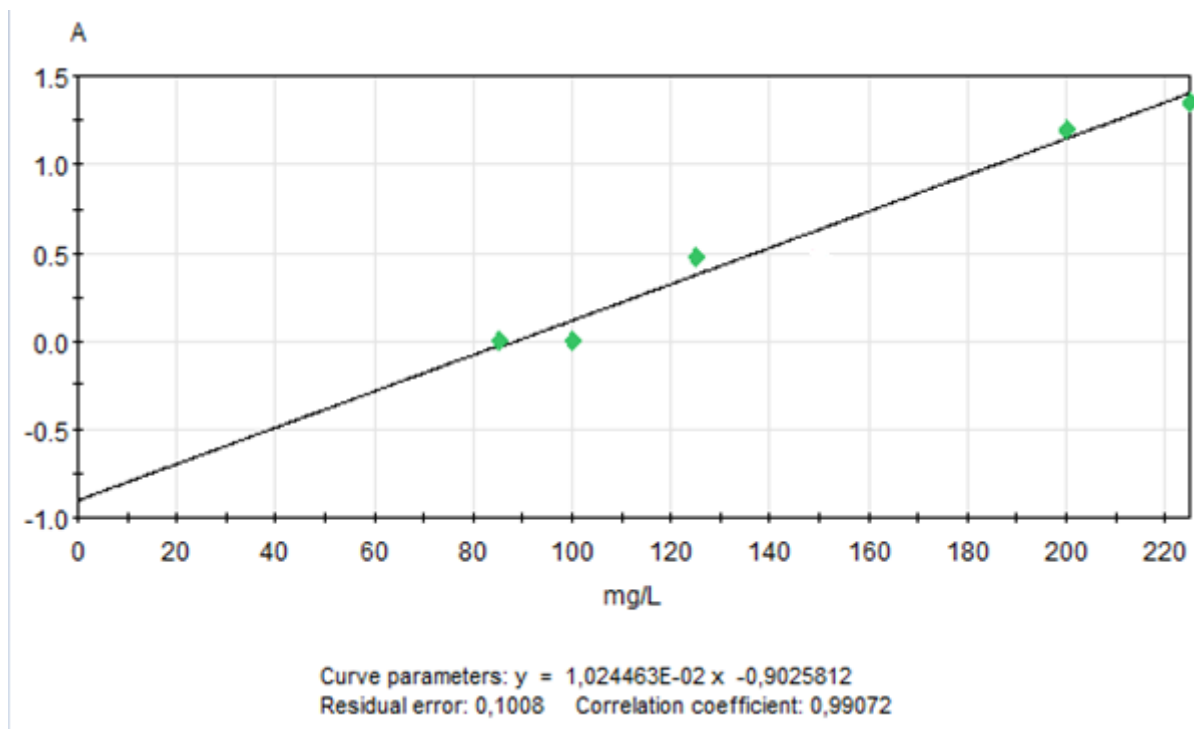


Curve parameters:  $y = 1,191723E-02 x + 0,2314018$   
 Residual error: 0,0895    Correlation coefficient: 0,99361

Anexo H. Curva de calibración de baja sensibilidad para una concentración de solventes 85:15 etanol-agua destilada (método Soxhlet)

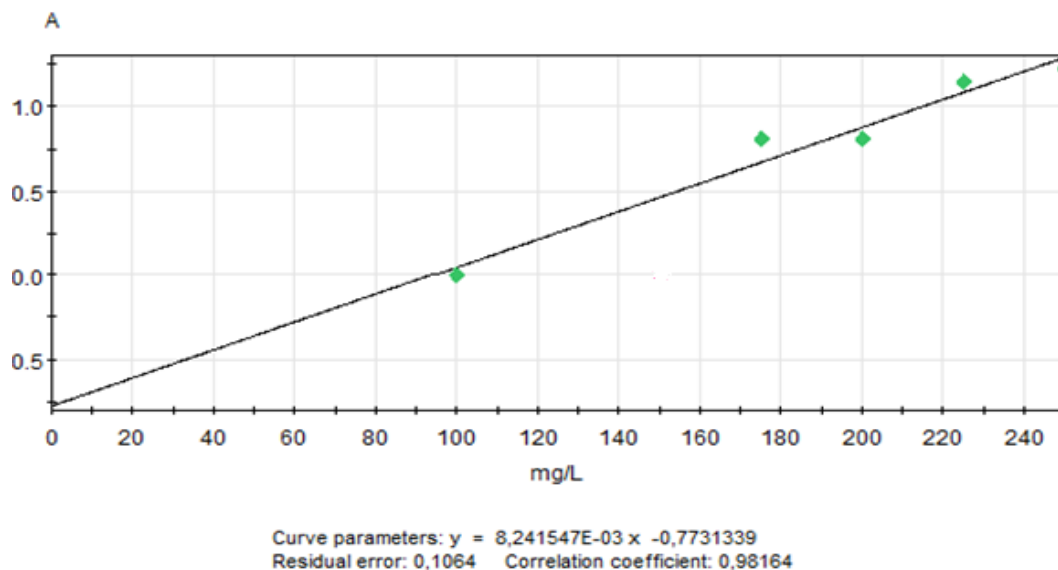


Anexo I. Curva de calibración de alta sensibilidad para una concentración de solventes 85:15 etanol-agua destilada (método Soxhlet)

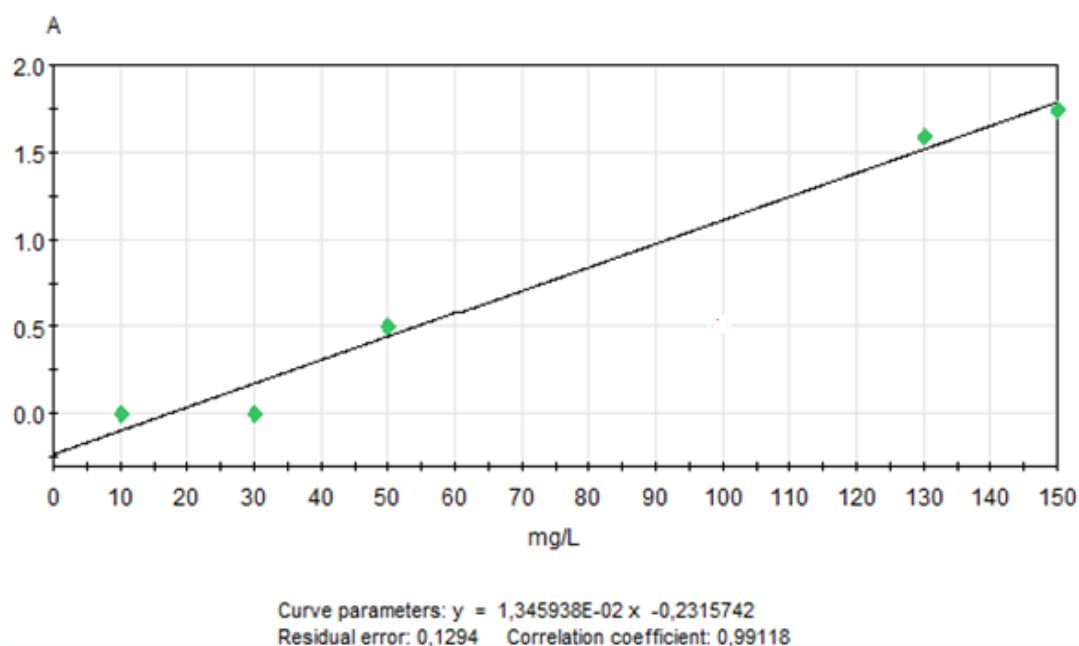




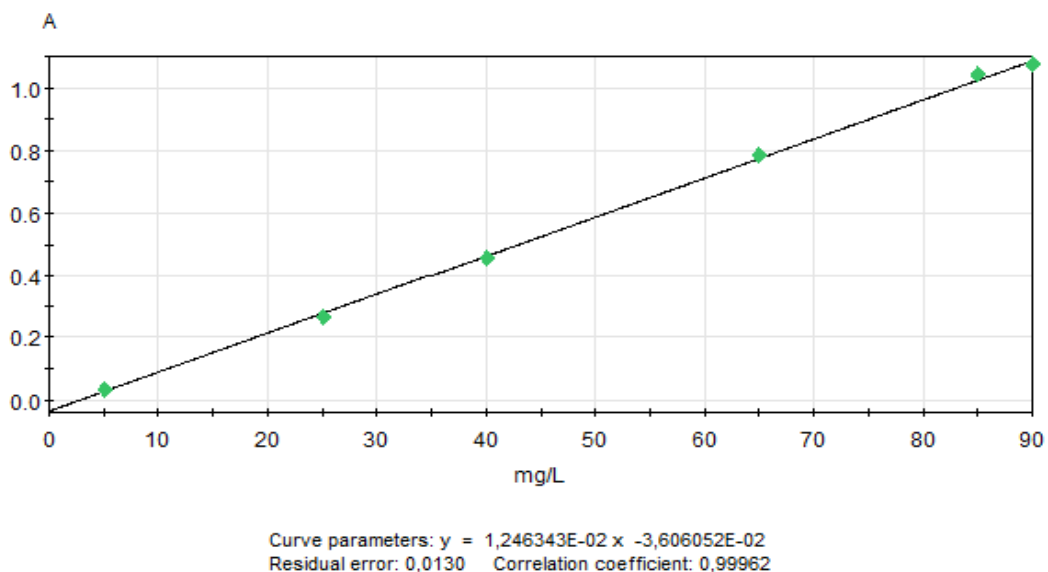
Anexo J. . Curva de calibración de baja sensibilidad para una concentración de solventes 70:30 etanol-agua destilada (método Soxhlet)



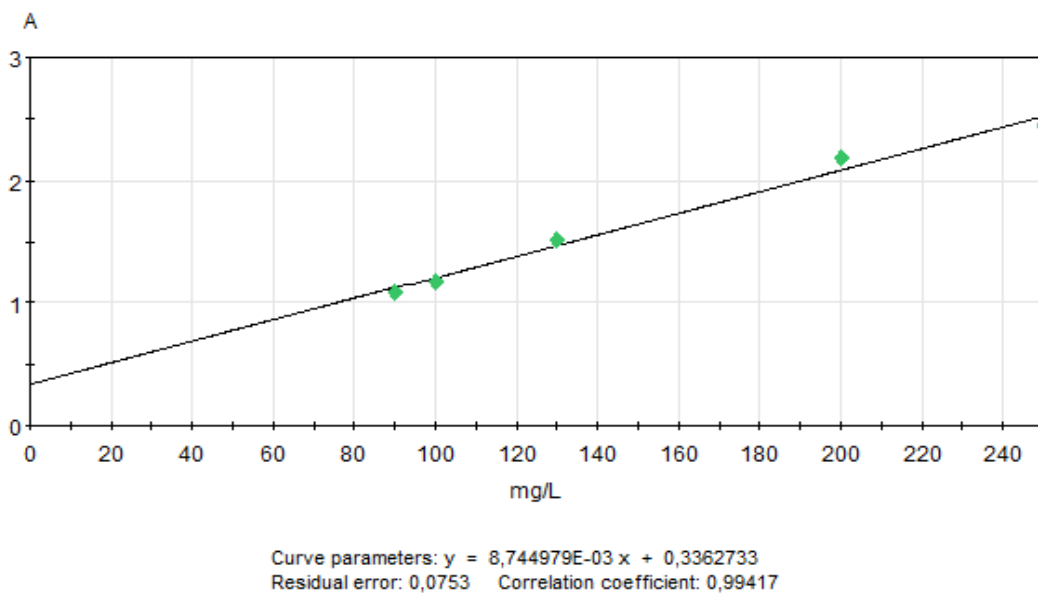
Anexo K. Curva de calibración de alta sensibilidad para una concentración de solventes 70:30 etanol-agua destilada (método Soxhlet)



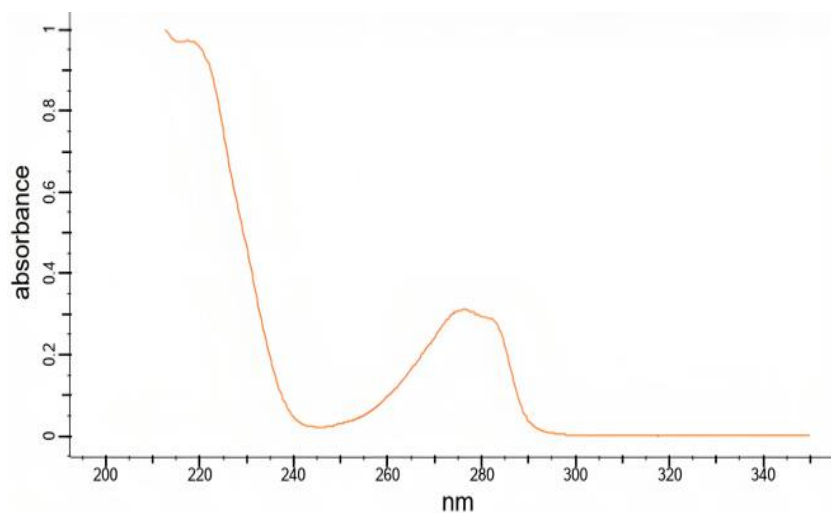
Anexo L. Curva de calibración de baja sensibilidad para la extracción con el método de arrastre de vapor



Anexo M. Curva de calibración de alta sensibilidad para la extracción con el método de arrastre de vapor



Anexo N. Rango de absorción del timol



Fuente: (SpectraBase, 2023)

Anexo O. Concentraciones de timol de los patrones usados para la construcción de las curvas de calibración

Curva de calibración	Concentración solución madre (ppm)	Concentraciones de los patrones (ppm)
Curva 100% etanol-agua de 40 a 180 ppm	2000	40, 80, 120, 160, 180
Curva 85% etanol-agua de 5 a 150 ppm	500	5, 30, 85, 100, 125, 150
Curva 85% etanol-agua de 85 a 225 ppm	500	85, 100, 125, 150, 200, 225
Curva 70% etanol-agua de 10 a 150 ppm	500	10, 30, 50, 100, 130, 150
Curva 70% etanol-agua de 100 a 250 ppm	500	100, 130, 150, 175, 200, 225, 250
Curva de arrastre de vapor de 90 a 250 ppm	500	90, 100, 130, 200, 250
Curva de arrastre de vapor de 5 a 90 ppm	500	5, 25, 40, 65, 85, 90