



UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA TIERRA
INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



PROYECTO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO
PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL

TEMA

OPTIMIZACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE A PARTIR
DE MEZCLAS DE ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS
AROMÁTICAS COMESTIBLES

AUTOR:

JHONNY OSWALDO GUEVARA OCAMPO

TUTORES:

DR. LUIS RAMÓN BRAVO SÁNCHEZ

DR. YASIEL ARTEAGA CRESPO

PASTAZA-ECUADOR

2018

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Jhonny Oswaldo Guevara Ocampo, con cédula de identidad 1500894983, declaro que las actividades realizadas para la realización y culminación del presente proyecto de investigación y desarrollo, que tiene como tema **“OPTIMIZACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE A PARTIR DE MEZCLAS DE ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS AROMÁTICAS COMESTIBLES”**, se basaron en la búsqueda de información, ideas, análisis, conclusiones y recomendaciones, que me guiaron para estructurar mi trabajo y sea considerado para posibles investigaciones futuras, basándose en los resultados obtenidos; además que me responsabilizo en forma legal y académicamente como el autor del presente trabajo previo a la obtención del título como Ingeniero Agroindustrial.

Puyo, 11 de junio del 2018

Jhonny Oswaldo Guevara Ocampo

CI. 1500894983

CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO

Certifico que el presente proyecto investigación y desarrollo sobre el tema **“OPTIMIZACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE A PARTIR DE MEZCLAS DE ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS AROMÁTICAS COMESTIBLES”**, previo a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial ha sido desarrollado por el Sr. Jhonny Oswaldo Guevara Ocampo bajo nuestra tutoría y dirección, cumpliendo con todos los requisitos y disponibilidades legales establecidos por la Universidad Estatal Amazónica “UEA”, por lo que autorizo su presentación.

Dr. Luis Ramón Bravo Sánchez
DIRECTOR DEL PROYECTO

Dr. Yasiel Arteaga Crespo
DIRECTOR DEL PROYECTO

CERTIFICADO DE APROBACIÓN POR TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

El Tribunal de sustentación del Proyecto de Investigación y Desarrollo aprueba el proyecto de investigación y desarrollo **“OPTIMIZACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE A PARTIR DE MEZCLAS DE ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS AROMÁTICAS COMESTIBLES”**.

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

RESUMEN EJECUTIVO Y PALABRAS CLAVES

RESUMEN

Se extrajeron aceites esenciales de *Coriandrum sativum* L., *Apium graveolens* L. y *Thymus vulgaris* L. mediante destilación por arrastre con vapor; los rendimientos obtenidos fueron mayores para el material vegetal seco que para el fresco. Para *Thymus vulgaris* L. los rendimientos fueron superiores a las otras dos especias. Se empleó un diseño estadístico de mezcla para determinar las proporciones de los aceites esenciales correspondientes a los puntos de medición de actividad antioxidante. Se utilizaron dos técnicas espectrofotométricas para evaluar dicha actividad antioxidante: FRAP y ABTS. Para los resultados por el método FRAP, los mejores ajustes correspondieron al modelo lineal, tanto para los aceites extraídos a partir del material foliar fresco como seco; para los obtenidos a través del método del radical ABTS, el modelo de mejor ajuste resultó ser del tipo especial cuártico. Las mezclas optimizadas de los tres aceites esenciales se caracterizaron por presentar un porcentaje de aceite de *Thymus vulgaris* L., significativamente superior y se determinó que existía sinergia o potenciación de la actividad antioxidante en todos los casos. La mezcla de mayor capacidad antioxidante contenía 79,3 % de *Thymus vulgaris* L., 10,3 % de *Coriandrum sativum* L. y 10,4 % de *Apium graveolens* L. y puede ser utilizada como aditivo para mejorar la funcionalidad y prolongar la vida útil de los alimentos.

PALABRAS CLAVES

Thymus vulgaris L., *Coriandrum sativum* L., *Apium graveolens* L., diseño de mezclas, actividad antioxidante, espectrofotometría

ABSTRACT AND KEYWORDS

ABSTRACT

Essential oils from *Coriandrum sativum* L., *Apium graveolens* L. and *Thymus vulgaris* L. by steam distillation were extracted; the yields obtained were greater for the dry plant material than for the fresh. For *Thymus vulgaris* L. the yields were higher than for the other two spices. A statistical mixture design in order to determine the proportions of the essential oils corresponding to the measuring points of antioxidant activity was used. Two spectrophotometric techniques for antioxidant activity evaluation were used: FRAP and ABTS. For the results obtained by the FRAP method, the best fits corresponded to the linear model for both of the oils extracted from fresh and dry foliar material; for the results obtained through the ABTS radical method, the best fitting model was the special quartic. The optimized mixtures of the three essential oils were those having a significantly higher percentage of *Thymus vulgaris* L. oil and it was determined that there was synergy or potentiation of the antioxidant activity in all cases. The mixture with the highest antioxidant capacity contained 79,3 % of *Thymus vulgaris* L., 10,3 % of *Coriandrum sativum* L. and 10,4 % of *Apium graveolens* L. oils and it can be used as an additive to improve functionality and extend the shelf life of foods.

KEYWORDS

Thymus vulgaris L., *Coriandrum sativum* L., *Apium graveolens* L., mixture design, antioxidant activity, spectrophotometry

Tabla de contenido

CAPÍTULO I.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	2
1.2. OBJETIVO GENERAL.....	3
1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
CAPÍTULO II.....	4
2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN.....	4
2.1.- PLANTAS AROMÁTICAS COMESTIBLES.....	4
2.1.2.- <i>Coriandrum sativum</i> L. (CILANTRO).....	5
2.1.3 <i>Apium graveolens</i> L. (APIO).....	5
2.2.- ACEITES ESENCIALES Y SU IMPORTANCIA EN LA ALIMENTACIÓN.....	6
2.2.1.- USOS EN LA INDUSTRIA.....	6
2.2.2.- COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES.....	7
2.2.2.1.- Aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> L. (Tomillo).....	7
2.2.2.2.- Aceite esencial de <i>Coriandrum sativum</i> L. (Cilantro).....	7
2.2.2.3.- Aceite esencial de <i>Apium graveolens</i> L. (Apio).....	8
2.3 MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE ACEITES ESENCIALES.....	8
2.3.1 Extracción con disolventes.....	8
2.3.2 Extracción por microondas.....	8
2.3.3 Destilación por arrastre de vapor.....	9
2.4.- ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE PLANTAS.....	9
2.5.- MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE....	9
2.5.1.- DPPH.....	10
2.5.2.- Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC).....	10
2.5.3.- Método de captación del radical ABTS. ⁺	10
2.5.4.- Método FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power).....	11
2.6 DISEÑO ESTADÍSTICO DE MEZCLAS.....	11
CAPÍTULO III.....	12
3. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	12
3.1. LOCALIZACIÓN.....	12
3.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	12
3.3. MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN.....	12
3.4. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	12

3.4.1. EQUIPOS, MATERIALES, UTENSILIOS, REACTIVOS E INSTRUMENTOS	12
3.4.2. SELECCIÓN Y PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	13
3.4.3. EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE LAS PLANTAS AROMÁTICAS COMESTIBLES: <i>Coriandrum sativum</i> L. (CILANTRO), <i>Apium graveolens</i> L. (APIO) y <i>Thymus vulgaris</i> L. (TOMILLO).....	13
3.4.4. DISEÑO ESTADÍSTICO DE MEZCLA PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE ACEITES ESENCIALES SOBRE LA BASE DE SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.	14
3.4.5. EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.	16
3.4.5.1. MÉTODO FRAP (FERRIC ION REDUCING ANTIOXIDANT POWER).	16
3.4.5.2. MÉTODO DEL RADICAL ABTS.....	17
CAPÍTULO IV.	18
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
4.1. SELECCIÓN Y PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	18
4.2. EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE LAS PLANTAS AROMÁTICAS COMESTIBLES: <i>Coriandrum sativum</i> L. (CILANTRO), <i>Apium graveolens</i> L. (APIO) y <i>Thymus vulgaris</i> L. (TOMILLO).....	18
4.3. OPTIMIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE MEZCLAS DE ACEITES ESENCIALES DE TRES ESPECIES VEGETALES COMESTIBLES.	19
CAPÍTULO V.	28
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	28
5.1. CONCLUSIONES	28
5.2. RECOMENDACIONES.....	28
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	29
ANEXO 1	35
ANEXO 2.....	36

CAPÍTULO I.

1. INTRODUCCIÓN

Los compuestos con potentes propiedades antioxidantes están ganando interés entre los fabricantes de alimentos y los consumidores a nivel mundial (Kukula-Koch *et al.*, 2015, 2016). La actividad antioxidante de los productos naturales ha sido ampliamente estudiada en los últimos años, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, y se han demostrado sus importantes propiedades en la eliminación de radicales libres. Esta actividad farmacológica influye en una variedad de procesos bioquímicos y ralentiza la progresión de enfermedades graves de la civilización, como: enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedades inflamatorias o infecciones (Kukula-Koch *et al.*, 2015, 2016).

Sobre la base de las preocupaciones crecientes acerca de la seguridad de las sustancias sintéticas que se agregan a los productos alimenticios, las industrias han comenzado a buscar fuentes naturales de antioxidantes como los aceites esenciales, que pueden ser utilizados como conservantes de alimentos, a la vez que añaden propiedades útiles desde el punto de vista nutricional (Ebrahimi & Khosravi-Darani, 2013).

Los aceites esenciales son sustancias aromáticas que se encuentran en numerosas plantas y pueden ser extraídos de diferentes partes como: hojas, tallos, flores y raíces. Son mezclas complejas de hidrocarburos, terpenos, alcoholes, compuestos carbonílicos, aldehídos aromáticos y fenoles. Los provenientes de especias y condimentos son cada vez más utilizados en la industria de los alimentos y farmacéutica. De los diferentes métodos de extracción de aceites esenciales, los más frecuentes son: la destilación por arrastre con vapor, la extracción con disolventes, la extracción con fluidos supercríticos y por medio del uso de microondas y asistida por ultrasonido (Peredo-Luna *et al.*, 2009).

Las mezclas de aceites esenciales preparadas mediante la combinación de los aceites esenciales individuales extraídos de plantas comestibles, pueden tener un perfil antioxidante más potente en comparación con un solo aceite esencial (Baj *et al.*, 2018).

En años recientes se ha empleado diseños estadísticos de mezclas para optimizar las propiedades antioxidantes de combinaciones de aceites esenciales.

Los experimentos de mezclas son una clase especial de experimentos de superficie de respuesta en los que el producto objeto de investigación se compone de varios

componentes o ingredientes. Los diseños para estos experimentos resultan útiles porque muchas actividades de diseño y desarrollo de productos en situaciones industriales implican fórmulas o mezclas. En estas situaciones, la respuesta depende de las proporciones de los diferentes ingredientes incluidos en la mezcla.

En el experimento de mezclas más simple, la respuesta (la calidad, actividad o rendimiento del producto) depende de las proporciones relativas de los ingredientes. Las cantidades se pueden establecer como: medidas en peso, volumen o alguna otra unidad (Pulido *et al.*, 2012).

Algunas plantas aromáticas frecuentemente empleadas en la elaboración de alimentos son: *Coriandrum sativum* L. (cilantro), *Apium graveolens* L. (apio) y *Thymus vulgaris* L. (tomillo), entre otras muchas (Sirocchi *et al.*, 2017).

Para demostrar actividad antioxidante existe una diversidad de métodos analíticos espectrofotométricos, como: DPPH, ABTS y FRAP (Granados, 2012).

Para ejecutar el método ABTS (Ácido 2,2 –azinobis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico), se genera químicamente el radical ABTS•, utilizando persulfato de potasio, a temperatura ambiente, en ausencia de luz, en un tiempo entre 12 a 16 horas. El persulfato de potasio y el ABTS reaccionan estequiométricamente. La actividad se mide por inhibición de la coloración del radical y lectura de absorbancia a una longitud de onda de 730 nm (Álvarez *et al.*, 2008).

Para la determinación espectrofotométrica de la actividad antioxidante mediante el método FRAP (Ferric ion reducing antioxidant Power), el complejo férrico: 2,4,6 – tripiridil-s-triazina (TPTZ) incoloro es reducido a complejo ferroso coloreado en medio ácido. Se registran las absorbancias a una longitud de onda de 593 nm (Leos-Rivas *et al.*, 2016).

1.1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál sería la proporción óptima de los aceites esenciales extraídos de *Coriandrum sativum* L. (cilantro), *Apium graveolens* L. (apio) y *Thymus vulgaris* L. (tomillo), que garantizaría la mayor actividad antioxidante de la mezcla resultante?

1.2. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una mezcla, optimizada en cuanto a actividad antioxidante, de aceites esenciales extraídos de *Coriandrum sativum* L. (cilantro), *Apium graveolens* L. (apio) y *Thymus vulgaris* L. (tomillo) que pueda ser empleada como aditivo alimentario.

1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el rendimiento de la destilación por arrastre con vapor de aceites esenciales a partir de *C. sativum*, *A. graveolens* y *T. vulgaris*.
2. Optimizar la actividad antioxidante de la mezcla de aceites esenciales sobre la base de los métodos FRAP y ABTS.

CAPÍTULO II.

2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1.- PLANTAS AROMÁTICAS COMESTIBLES

Las plantas aromáticas, por definición, son aquellas que desprenden de sus hojas o flores un aroma más o menos intenso. En cuanto a sus posibles usos cotidianos, cabe destacar los siguientes (Castañeda *et al.*, 2007):

- 1) Condimentos de alimentos para aportar sabor y aroma.
- 2) Remedios medicinales curativos o preventivos.
- 3) Repelentes naturales de plagas.

2.1.1.- *Thymus vulgaris* L. (TOMILLO)

Es una especie de planta con flores de la familia de la menta, nativa del sur de Europa, desde el Mediterráneo occidental al sur de Italia (Tabla 1). Es un arbusto de hoja perenne, de base arbolada, con pequeñas hojas aromáticas de color gris-verde y racimos de flores de color púrpura o rosa (Dorling, 2008). El tomillo crece bien en un clima de templado a cálido, seco y soleado (Hosseinzadeh *et al.*, 2015).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Thymus vulgaris* L. (Tomillo)

Reino	<u>Plantae</u>
División	<u>Magnoliophyta</u>
Clase	<u>Magnoliopsida</u>
Orden	<u>Lamiales</u>
Familia	<u>Lamiaceae</u>
Subfamilia	<u>Nepetoideae</u>
Tribu	<u>Mentheae</u>
Género	<u><i>Thymus</i> L., 1753</u>

Fuente: (Dorling, 2008)

Thymus vulgaris L., presenta en su composición metabólica, monoterpenos oxigenados: 56,53 %, hidrocarburos monoterpénicos: 28,69 %, hidrocarburos sesquiterpénicos: 5,04 % y sesquiterpenos oxigenados: 1,84 % (Kaya *et al.*, 2013).

La especie fue utilizada desde la antigüedad por los griegos como un aromatizante en sus templos y por los romanos en la cocina. Actualmente se usa en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética (Shabnum & Wagay, 2011). Posee propiedades antioxidantes,

antibacterianas, antiinflamatorias, antivirales y como insecticida (Marino & Bersani, 1999).

2.1.2.- *Coriandrum sativum* L. (CILANTRO).

Es una hierba anual, sus semillas y hojas son muy utilizadas en las cocinas tradicionales de América Latina, India y China (Tabla 2). Es una fuente potencial de lípidos y su aceite esencial es rico en linalol (Sahib *et al.*, 2013).

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Coriandrum sativum* L. (Cilantro)

Reino	<u>Plantae</u>
División	<u>Magnoliophyta</u>
Clase	<u>Magnoliopsida</u>
Orden	<u>Apiales</u>
Familia	<u>Apiaceae</u>
Subfamilia	<u>Apioideae</u>
Tribu	Coriandreae
Género	<u><i>Coriandrum</i></u>

Fuente: (Torres-Aguirre *et al.*, 2018)

La composición metabólica del cilantro se basa principalmente en aceites esenciales, entre ellos d-linalol, 70 a 90 % pineno, dipenteno, geraniol, felandreno, borneol, limoneno, cineol, canfeno, citronelol, coriandrol y linalol (Infoagro, 1997).

En los países en vías de desarrollo, *Coriandrum sativum* L., es utilizado en alimentos y como medicamento natural por sus variadas propiedades, a nivel casero e industrial (Morales, 1995).

Sus actividades farmacológicas principales son: como antimicrobiano, antioxidante, antidiabético, ansiolítico, antiepiléptico, antidepresivo, antimutagénico, antiinflamatorio, antidislipidémico, antihipertensivo, neuroprotector y diurético (Sahib *et al.*, 2013).

2.1.3 *Apium graveolens* L. (APIO)

Apium graveolens es una planta nativa de la llanura de Italia, donde se extendió a Suecia, Egipto, Argelia, Etiopía e India. Las flores son pequeñas y blancas, los dientes del cáliz son absolutos (Tabla 3). Posee cinco pétalos ovados agudos con puntas enharinadas (Fazal & Singla, 2012).

En los países en desarrollo, el apio es utilizado en alimentos y medicinas. Se emplea directamente en la cocina tradicional y en la industrialización, como aditivo funcional (Kooti *et al.*, 2014).

Tabla 3. Clasificación taxonómica de *Apium graveolens* L. (Apio)

Reino	<u>Plantae</u>
División	<u>Magnoliophyta</u>
Clase	<u>Magnoliopsida</u>
Orden	<u>Apiales</u>
Familia	<u>Apiaceae</u>
Género	<u>Apium</u>

Fuente: (Kooti *et al.*, 2014)

2.2.- ACEITES ESENCIALES Y SU IMPORTANCIA EN LA ALIMENTACIÓN

Los aceites esenciales son sustancias aromáticas que se encuentran en numerosas plantas y pueden ser extraídos de diferentes partes como: hojas, tallos, flores y raíces. Las plantas contienen de 0,01 a 10 % de contenido de aceite esencial. La cantidad media que se encuentra en la mayoría de las plantas aromáticas es alrededor de 1 a 2%. Son mezclas complejas de hidrocarburos, terpenos, alcoholes, compuestos carbonílicos, aldehídos aromáticos y fenoles. Los provenientes de especias y condimentos son cada vez más utilizados en la industria de los alimentos y farmacéutica (Peredo-Luna *et al.*, 2009). Después de la extracción generalmente son líquidos y rara vez sólidos o pastosos. Numerosas investigaciones han permitido establecer su actividad antioxidante, antibacteriana, antimicótica, antiparasitaria, antiviral e insecticida (Alzamora, *et al.*, 2001).

2.2.1.- USOS EN LA INDUSTRIA

En la industria de alimentos se emplean como condimentos y saborizantes, en la industria cosmética para la fabricación de perfumes y aromatizantes y en la farmacéutica como saborizantes (Cerutti & Neumayer, 2004).

Los aceites esenciales de plantas aromáticas tienen propiedades conservantes como antioxidantes y antimicrobianos y se obtienen de fuentes comestibles (Suhaj, 2006). Varias investigaciones han dado a conocer sobre las actividades antioxidantes de productos naturales como aceites esenciales (Sacchetti *et al.*, 2005).

En los últimos años se ha pretendido introducir aceites esenciales como fuente principal de antioxidantes en diferentes tipos de alimentos (Olmedo *et al.*, 2012).

Dentro de los alimentos funcionales elaborados con la adición de aceites esenciales están, productos cárnicos (Medina, *et al.*, 2003) y alimentos de origen lácteo, tanto funcionales como fortificados y enriquecidos, que representan un beneficio para la salud del consumidor (Santillán-Urquiza, *et al.*, 2014).

La actividad antioxidante de un el aceite esencial está relacionada con su composición química (Guimaraes *et al.*, 2010).

2.2.2.- COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES

2.2.2.1.- Aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. (Tomillo)

En la tabla 4 se resume la composición química de estos aceites.

Tabla. 4. Composición química de los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* L.

COMPUESTO	%	COMPUESTO	%	COMPUESTO	%
α- thujene	2,84	thymol methyl ether	1,78	terpinolene	0,19
α- pinene	2,97	thymol	46,2	linalool	0,13
β- pinene	0,71	carvacrol	2,44	terpinen-4-ol	3,99
octan-1-en-0-ol	0,48	terpinyl acetate	0,68	β- bisabolene	0,33
mycrene	3,45	eugenol	0,10	δ- cadinene	0,14
α – phellandrene	0,42	β- bourbonene	0,09	caryophyllene oxide	0,21
α – terpinene	2,69	β- elemene	0,14	γ-terpinene	14,1
p-cymene	9,91	methyl eugenol	0,21	cis-sabinen hydrate	0,25
limonene	1,23	β- caryophyllene	1,64	α humulene	0,40
1,8-cineole	1,96	germacrene D	0,16	β- copaene	0,17

Fuente: (Shabnum & Wagay, 2011)

2.2.2.2.- Aceite esencial de *Coriandrum sativum* L. (Cilantro)

En la tabla 5 se aprecia la composición química de estos aceites.

Tabla. 5. Composición química de los aceites esenciales de *Coriandrum sativum* L.

COMPUESTO	%	COMPUESTO	%	COMPUESTO	%
g-Thionodecalactone	0,2	Anisole, P-allyl	0,3	Dodecanal	1,3
1,2-Decanediol	0,5	Benzene	0,1	Dodecanoic acid	2,6
n-Cetyl alcohol	0,4	Cinene	0,1	E-11-tetradecenoic acid	13
2,4-Dimethylheptane	0,2	Z-Nonene	0,1	Ethylidenecyclooctane	0,3
2-Decenoic acid	30	Cyclododecane	2,5	Eucalyptol	0,3
2-Dodecanal	1,3	Cyclooctanol	0,6	1-Pentadecene	0,1
2-Tridecenal, (E)	1,0	Decahydroazulene	0,4	Caryophyllene	0,3

2-Undecenal	3,9	Decamethylene glycol	1,2	Pinene	0,5
4-Allylphenyl acetate	0,2	Decanal	1,4	m-Mminoaniline	0,3
5-Nonanol ,5-methyl	0,3	d-Limonene	0,2	Capric acid	13
Nonanoic acid	1,2	Oxirane tetradecyl	0,1	Undecanal	0,3
Nonanol	0,4	Oxirane, octyl	0,3	Undecanoic acid	2,1
Octanoic acid	0,6	2-Ethyl-3-methyl thiophane	0,2	Undecyl alcohol	6,4
o-Cymene	0,1	Undecanoic acid	5,0	Undecylenic acid	0,3
Oleic acid	0,6	Tridecanoic acid	5,5		

Fuente: (Sahib *et al.*, 2013)

2.2.2.3.- Aceite esencial de *Apium graveolens* L. (Apio)

En la tabla 6 se aprecia la composición química de estos aceites.

Tabla. 6. Composición química de los aceites esenciales de *Apium graveolens* L.

COMPUESTO	%	COMPUESTO	%
D-Limonene	57,7	Trans-Limonene Oxide	0,3
Myrcene	18,7	α - Terpinolene	0,3
4-Terpineol	8,60	α -selinen	0,2
β -Selinene	8,10	Trans-3-butylidenephthalide	0,1
β -pinen	2,40	α - Muuroloene	0,1
β - caryophyllene	0,50	Cis-Limonene Oxide	0,1
Carnone	0,30	Linalool	0,1
Trans-ocimene	0,10	α - pinen	0,1

Fuente: (Kooti *et al.*, 2015)

2.3 MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE ACEITES ESENCIALES

2.3.1 Extracción con disolventes

En este método se utilizan muestras frescas o secas y molidas y disolventes volátiles como: etanol y cloroformo, entre otros. Los disolventes solubilizan la esencia y extraen otras sustancias (grasas y ceras) en forma de una oleorresina o extracto impuro. Se utiliza generalmente solo a escala de laboratorio, por los elevados costos de los disolventes orgánicos (Martínez, 2003; Molina, *et al.*, 2016).

2.3.2 Extracción por microondas

Es una alternativa para la extracción de aceites esenciales, la técnica puede utilizarse como un método convencional como la hidrodestilación. Es necesario modificar un horno de microondas haciendo un orificio en la parte superior y conectando un matraz con un sistema de refrigeración (Bayramoglu *et al.*, 2008).

Los beneficios son: la reducción del tiempo y la disminución de la energía que se consume. Este método se puede emplear a escala industrial mediante reactores si se requiere un buen manejo y seguridad (Bousbia *et al.*, 2009).

2.3.3 Destilación por arrastre de vapor

La muestra vegetal fresca o seca, cortada en trozos pequeños, entra en una cámara que es sometida a una corriente de vapor de agua sobrecalentado. Así, se arrastra la esencia condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa. Este método se utiliza a nivel industrial debido a su rendimiento y no se necesita de tecnología sofisticada. (Peredo-Luna *et al.*, 2009).

El equipo más conocido para la destilación por arrastre con vapor es la llamada trampa Clevenger, considerada internacionalmente como la más adecuada para la determinación del contenido total del aceite esencial de una planta aromática. La trampa está compuesta por un balón, donde se deposita la materia prima molida y una cantidad conocida de agua pura. Se le calienta constantemente y el aceite esencial, con el agua, se evaporan continuamente. Un condensador acoplado al balón y un reservorio final permite separar el aceite esencial de la mezcla condensada (Peredo-Luna *et al.*, 2009).

2.4.- ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE PLANTAS

Los antioxidantes son compuestos que pueden inhibir o retardar la oxidación de otras moléculas inhabilitando la iniciación o propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres (Avello & Pastene, 2005; Chávez, *et al.*, 2011).

Los antioxidantes naturales con la consabida seguridad de no ser tóxicos han dado lugar a una gran cantidad de estudios sobre el potencial antioxidante de los aceites esenciales. Esto permite sustituir el consumo mayoritario de antioxidantes sintéticos comunes como: butilhidroxianisol (BHA) y butilhidroxitolueno (BHT), que no garantizan la salud humana (Amorati *et al.* 2013).

2.5.- MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Cada método se relaciona con la generación de un diferente radical, que actúa a través de una variedad de mecanismos (Álvarez *et al.*, 2008).

2.5.1.- DPPH

El método de eliminación de radicales DPPH es adecuado para la evaluación de la efectividad antioxidante porque este radical es más estable que los radicales hidroxilos o superóxido. El DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) es un radical resistente que pierde su color púrpura cuando acepta un electrón de una molécula antioxidante (Bajalan *et al.*, 2017).

El fundamento del método DPPH, consiste en que este radical tiene un electrón desapareado y se decolora hacia amarillo pálido por la reacción de oxidación reducción en presencia de una sustancia antioxidante. La medida espectrofotométrica se realiza a 517 nm. Por diferencia de absorbancia se determina el porcentaje de captación de radical libre DPPH a una concentración de 20 mg/L (Brand-Williams *et al.* 1995; Guija-Poma *et al.*, 2015; Rather *et al.*, 2012).

2.5.2.- Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC)

El método ORAC consiste en medir la disminución en la fluorescencia de una proteína como resultado de la pérdida de su conformación cuando esta sufre un daño oxidativo causado por una fuente de radicales peróxidos (ROO•).

El método evalúa la capacidad de los antioxidantes en la muestra para proteger la proteína del daño oxidativo (Leos-Rivas *et al.*, 2016).

2.5.3.- Método de captación del radical ABTS.⁺

El catión radical ABTS [2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) ácido] es la base de uno de los métodos espectrofotométricos que se han aplicado a la medición de la actividad antioxidante total de disoluciones de sustancias puras, mezclas acuosas y bebidas.

Es una técnica de decoloración en la que el radical se genera directamente en una forma estable antes de reacción con supuestos antioxidantes (Pellegrini *et al.*, 1999).

El ABTS se disuelve en agua hasta una concentración de 7 mM. El catión radical ABTS se prepara con persulfato de potasio 2,45 mM. Se mezcla y se deja en reposo durante 12- 16 horas antes de su uso, obteniendo su color oscuro característico. Para el estudio de compuestos fenólicos y alimentos extractos, la disolución ABTS•⁺, se diluyó con etanol y

para antioxidantes plasmáticos con PBS, a un pH 7,4, a una absorbancia de 0,70 a 734 nm y equilibrada en 30 °C (Re *et al.*, 2005).

El método descrito mide actividad antioxidante de; carotenoides, compuestos fenólicos y algunos antioxidantes del plasma, determinados por la decoloración del ABTS•, midiendo la reducción del catión radical como el porcentaje de inhibición de la absorbancia 734 nm (Re *et al.*, 2005).

2.5.4.- Método FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power)

Este método se basa en la capacidad que tiene la sustancia antioxidante para reducir el Fe³⁺ a Fe²⁺. El complejo férrico: 2, 4, 6 – tripiridil-s-triazina (TPTZ) incoloro es reducido a complejo ferroso coloreado. Se empleará una curva de calibración confeccionada con patrón de TROLOX (Leos-Rivas *et al.*, 2016).

Las muestras se prepararán mediante dilución 1:1000 v/v con metanol y se conservarán a 4°C si fuese necesario. Luego se colocarán 80 µL de esta disolución de muestra en un matraz de 10 mL y se adicionarán 5 mL de disolución de FRAP. Se enrasará con agua destilada. Se dejará reposar en una estufa a 37 °C por 30 minutos. Se registrarán las absorbancias a una longitud de onda de 593 nm (Leos-Rivas *et al.*, 2016).

2.6 DISEÑO ESTADÍSTICO DE MEZCLAS

Los experimentos de mezclas son una clase especial de experimentos de superficie de respuesta en los que el producto objeto de investigación se forma de varios componentes o ingredientes. Los diseños para estos experimentos resultan útiles porque muchas actividades de diseño y desarrollo de productos en escenarios industriales implican fórmulas o mezclas. En estas situaciones, la respuesta depende de las proporciones de los diferentes ingredientes incluidos en dicha mezcla.

En el experimento de mezclas más simple, la respuesta (la calidad, actividad o rendimiento del producto) depende de las proporciones relativas de los ingredientes. Las cantidades se pueden establecer como: medidas en peso, volumen o alguna otra unidad (Pulido *et al.*, 2012).

CAPÍTULO III.

3. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. LOCALIZACIÓN

La investigación se realizó en el laboratorio de Química de la Universidad Estatal Amazónica (UEA), ubicada en el km 2 ½ vía al Tena, provincia Pastaza con una altitud de 940 m.s.n.m., latitud de 0° 59' -1" y longitud de 77° 49' 0" W.

3.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN

Se llevó a cabo una investigación de tipo aplicada, fundamentada en la experimentación.

3.3. MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN

Se emplearon métodos cuantitativos que permitieron controlar las variables independientes; se realizaron cálculos numéricos y análisis estadísticos basados en el diseño de mezclas para establecer modelos de comportamiento y optimizar la actividad antioxidante.

3.4. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

3.4.1. EQUIPOS, MATERIALES, UTENSILIOS, REACTIVOS E INSTRUMENTOS

- Balanza analítica ADAM. Alemania
- Balanza técnica THOMAS Scientific. TSXB4200C. Estados Unidos.
- Extractor de aceites esenciales. FIGMAY®. Argentina.
- Micropipeta Eppendorf Research Plus 100 – 1000 µL. Alemania
- Micropipeta Eppendorf Research Plus 10 – 100 µL. Alemania
- Espátulas de laboratorio
- Viales de plástico 2 y 10 mL
- Agua destilada
- Metanol, MERCK. Alemania
- Etanol, MERCK. Alemania
- Ácido clorhídrico 40 mM
- 2,4,6 – tripiridil – s -triazina (TPTZ). SIGMA-ALDRICH. Alemania.
- ácido 2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS). SIGMA-ALDRICH. Alemania.
- cloruro de hierro III. MERCK. Alemania
- acetato de sodio. MERCK. Alemania

- Cristalería común de laboratorio, incluido material volumétrico
- Espectrofotómetro UV-Vis Thermo Electron Corporation. Estados Unidos.
- pH-metro Thermo Electron Corporation. Estados Unidos.
- persulfato de potasio 2,45mM. MERCK. Alemania
- Apio, Tomillo y Cilantro frescos

3.4.2. SELECCIÓN Y PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Las especies vegetales comestibles: *Coriandrum sativum* L. (cilantro), *Apium graveolens* L. (apio) y *Thymus vulgaris* L. (tomillo) fueron adquiridas en el mercado local por tratarse de plantas domesticadas, de alto consumo por la población.

Se separó el material foliar, se lavó con agua corriente y agua destilada, parte del material vegetal se sometió posteriormente a secado al aire, a temperatura ambiente y a la sombra, durante 72 horas y se dividió finamente con la ayuda de tijeras previo a la extracción.

3.4.3. EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE LAS PLANTAS AROMÁTICAS COMESTIBLES: *Coriandrum sativum* L. (CILANTRO), *Apium graveolens* L. (APIO) y *Thymus vulgaris* L. (TOMILLO)

Se empleó la destilación por arrastre con vapor mediante un equipo extractor de aceites esenciales a escala laboratorio, fabricado por FIGMAY® (Argentina) para separar los aceites más ligeros que el agua (Figura 1).

Se colocaron cantidades exactamente pesadas de material vegetal fresco o seco de cada especie vegetal en el extractor y se realizó la extracción de los aceites esenciales durante 30 minutos.

Posteriormente se separó la fase oleosa (fase superior) del agua a través del dispositivo de separación del equipo.



Figura 1. Equipo extractor de aceites esenciales FIGMAY® (Argentina).

Se determinó cuantitativamente el rendimiento para cada uno de los aceites esenciales a partir del peso seco y fresco de cada planta aromática, a través de la siguiente fórmula:

$$R(\%) = \frac{Pa * 100}{Pm} \quad (1)$$

Donde:

R (%) – rendimiento

Pa – peso del aceite (g)

Pm – peso del material vegetal seco (g)

3.4.4. DISEÑO ESTADÍSTICO DE MEZCLA PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE ACEITES ESENCIALES SOBRE LA BASE DE SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

Se empleó un diseño: “Simplex-Lattice” (S-LD) (Cornell, 2011; Goupy & Creighton, 2006) para determinar los puntos de medición de actividad antioxidante (proporciones de los aceites esenciales). Este tipo de sistema posee puntos experimentales simétricamente distribuidos y una ecuación polinomial bien seleccionada para representar la superficie de respuesta.

El efecto del S-LD sobre la actividad antioxidante fue analizado utilizando el método de regresión múltiple de cuadrados mínimos. Para este experimento se emplearon ecuaciones de regresión múltiple típicas, tales como:

Modelo lineal:

$$y = b_1 * x_1 + b_2 * x_2 + b_3 * x_3 \quad (2)$$

Modelo cuadrático:

$$y = b_1 * x_1 + b_2 * x_2 + b_3 * x_3 + b_{12} * x_1 * x_2 + b_{13} * x_1 * x_3 + b_{23} * x_2 * x_3 \quad (3)$$

Donde, y—es la variable respuesta (actividad antioxidante), xi- representan los ingredientes de la mezcla (puntos independientes o, de entrada), y bi, bij, bijk, dij- son los coeficientes de la función de regresión (Yolmeh *et al.*, 2017).

Los modelos descritos anteriormente, utilizando una función polinomial de 3^{er} grado, fueron usados para describir la superficie de respuesta. Los siguientes parámetros: suma de cuadrados, media de los cuadrados, grados de libertad, prueba F, valores de probabilidad, R-cuadrado (R²), R-cuadrado ajustado, fueron considerados cuando se seleccionó el modelo estadístico apropiado (Cornell, 2011; Goupy & Creighton, 2006).

El diseño propuesto se detalla en la Tabla 7.

Tabla 7. Diseño experimental de mezclas empleado para la optimización de la actividad antioxidante

Mezcla	<i>Thymus vulgaris</i> L. (A)	<i>Coriandrum sativum</i> L. (B)	<i>Apium graveolens</i> L. (C)
1	0,1667	0,6667	0,1667
2	0,5	0	0,5
3	0	0	1
4	0,5	0,5	0
5	1	0	0
6	0,6667	0,1667	0,1667
7	0	1	0
8	1	0	0
9	0	0	1
10	0,1667	0,1667	0,6667
11	0	1	0
12	0	0,5	0,5
13	0,3333	0,3333	0,3333

Fuente: Simplex-Lattice” (Cornell, 2011; Goupy & Creighton, 2006).

Como variable respuesta se empleó la actividad antioxidante calculada espectrofotométricamente por dos métodos: FRAP y ABTS (Pulido *et al.*, 2000).

3.4.5. EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

3.4.5.1. MÉTODO FRAP (FERRIC ION REDUCING ANTIOXIDANT POWER).

Este método se basa en la capacidad que tiene la sustancia antioxidante para reducir Fe^{3+} a Fe^{2+} . El complejo férrico: 2,4,6 – tripiridil-s-triazina (TPTZ) incoloro es reducido a complejo ferroso coloreado. Se empleó una curva de calibración confeccionada con patrón de TROLOX. El reactivo FRAP se preparó de la siguiente manera:

Primero, se preparó el buffer de acetato 0,3 mM a pH 3,6, para lo cual se pesó 6,1 mg de acetato de sodio trihidratado, se disolvió en 200 mL de agua, se ajustó el pH con una disolución de ácido clorhídrico 40 mM y finalmente se aforó a 250 mL con agua destilada.

Para preparar la disolución de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), se pesó 31,2 mg y se disolvió en ácido clorhídrico 40 mM hasta aforar en 10 mL.

Luego se preparó una disolución 20 mM de cloruro de hierro III, a partir de la sal hexahidratada, para lo cual se pesó 135,2 mg y se disolvió en agua destilada hasta aforar en 25 mL.

Finalmente, cada disolución se mezcló en proporción 1:1:10 de TPTZ: cloruro de hierro III : buffer acetato para obtener el reactivo FRAP (Leos-Rivas *et al.*, 2016).

Las muestras se prepararon mediante dilución 1:1000 v/v con metanol y se analizaron inmediatamente. Luego se colocaron 40 μL de esta disolución de muestra en un matraz de 10 mL y se adicionaron 5 mL de disolución de FRAP. Se enrasó con agua destilada. Se dejó reposar en una estufa a 37°C por 30 minutos. Se registraron las absorbancias a una longitud de onda de 593 nm.

Los cálculos se realizaron empleando el modelo matemático de la curva de calibración de TROLOX (patrón de antioxidantes):

$$C = \frac{A}{0,1879} \quad (4)$$

A – valor de absorbancia de las muestras.

3.4.5.2. MÉTODO DEL RADICAL ABTS.

El radical $ABTS^{\bullet+}$ se generó a partir de su precursor el ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS); es un compuesto de color verde-azulado, estable.

Métodos de generación del radical $ABTS^{\bullet+}$:

- Disolución de ABTS 7mM. Se disolvieron 0,0384 g de sal amónica cristalizada de ABTS en 10 mL de agua destilada.
- Disolución de persulfato de potasio 2,45mM. Se disolvieron 0,0662 g del reactivo en 100 mL de agua destilada.
- Etanol al 96 % v/v.
- Preparación radical $ABTS^{\bullet+}$. Se mezcló a partes iguales la disolución de ABTS 7mM y la de persulfato de potasio 2,45mM. Se mantuvo en la oscuridad a temperatura ambiente durante 16 horas para la formación del radical. Se diluyó con etanol para obtener una absorbancia de 0,8730 (absorbancia inicial) a 730 nm.
- Preparación de las muestras de ensayo. En la cubeta del espectrofotómetro se colocaron 20 μ L de las diferentes mezclas, diluidas 1:1000 v/v en metanol y se adicionaron 3 mL de la disolución del radical $ABTS^{\bullet+}$. Se esperó 7 minutos hasta estabilización de la absorbancia y se realizó la lectura a 730 nm.

Los cálculos se realizaron empleando el modelo matemático de la curva de calibración de TROLOX (patrón de antioxidantes):

$$C = \frac{A - 0,7252}{-0,1304} \quad (5)$$

A – valor de absorbancia de las muestras.

CAPÍTULO IV.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. SELECCIÓN Y PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Se empleó material vegetal fresco y seco de *Coriandrum sativum* L. (CILANTRO), *Apium graveolens* L. (APIO) y *Thymus vulgaris* L. (TOMILLO), con el propósito de evaluar comparativamente la actividad antioxidante de los aceites esenciales extraídos y sus mezclas. Para la obtención del material seco se seleccionó el método de secado al aire, a temperatura ambiente y a la sombra, durante 72 horas, para lograr en lo posible que se volatilizaran los aceites a emplear.

4.2. EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE LAS PLANTAS AROMÁTICAS COMESTIBLES: *Coriandrum sativum* L. (CILANTRO), *Apium graveolens* L. (APIO) y *Thymus vulgaris* L. (TOMILLO)

Se utilizó la destilación por arrastre con vapor pues es un método muy eficaz y de amplio uso a nivel de laboratorio para la separación de aceites esenciales a partir de material vegetal (Peredo-Luna *et al.*, 2009).

Los rendimientos calculados para cada uno de los aceites esenciales, sobre la base del peso seco y fresco de cada planta aromática, se reflejan en la Tabla 8.

Tabla 8. Rendimientos de aceites esenciales sobre la base de los pesos seco y fresco para cada especie vegetal en estudio.

Rendimiento	<i>Apium graveolens</i> L.	<i>Coriandrum sativum</i> L.	<i>Thymus vulgaris</i> L.
Fresco (%)	0,01788	0,04250	0,3051
Seco (%)	0,1268	0,2247	0,3289

Fuente: Elaboración propia

Los rendimientos más elevados, a partir de materia fresca, se obtuvieron para *Thymus vulgaris* L. Debido a que esta planta posee un nivel de humedad muy bajo (7,8 %), no

existe una diferencia apreciable entre el rendimiento sobre la base de materia seca y el calculado para materia húmeda.

Para *Apium graveolens* L. y *Coriandrum sativum* L., los porcentajes de humedad oscilaron entre el 90 y el 95 %, por lo que la diferencia fue significativa en cuanto a rendimiento de aceites esenciales. Cabe esperar, en estos casos, una mayor diferencia en cuanto a composición de ambos aceites (a partir de materia seca o fresca) por el secado prolongado que es necesario practicar en condiciones de temperatura ambiental y sombra durante el cual pudiera haberse perdido alguna fracción más volátil.

Adicionalmente, es importante destacar que los aceites obtenidos a partir de materia seca poseían coloraciones más intensas que aquellos extraídos de material vegetal fresco.

4.3. OPTIMIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE MEZCLAS DE ACEITES ESENCIALES DE TRES ESPECIES VEGETALES COMESTIBLES.

El objetivo de la optimización fue encontrar una combinación de los tres aceites en estudio que garantizaran una mayor actividad antioxidante.

Las variables respuesta obtenida en cada caso, para cada uno de los métodos de análisis y los materiales empleados en las mezclas, se observan en la Tabla 9.

Tabla 9. Diseño experimental de mezclas para la optimización de la actividad antioxidante

Exp.	<i>T. vulgaris</i>	<i>C. sativum</i>	<i>A. graveolens</i>	*ABTS (%I)	*FRAP (mg eq. Trolox)	FRAP (mg eq. Trolox)
1	0,166667	0,666667	0,166667	63,3687	56,2799	75,5721
2	0,5	0	0,5	98,351	167,11	185,205
3	0	0	1	0,824499	14,9548	19,9042
4	0,5	0,5	0	95,053	142,496	180,548
5	1	0	0	99,7031	269,159	268,228
6	0,666667	0,166667	0,166667	94,4774	175,226	199,574
7	0	1	0	1,41343	7,50399	8,96062
8	1	0	0	99,5249	247,206	298,164
9	0	0	1	3,41578	16,0192	24,0553
10	0,166667	0,166667	0,666667	55,2415	64,396	71,3145
11	0	1	0	0,824499	5,32198	7,50399
12	0	0,5	0,5	1,41343	5,00266	10,8568
13	0,333333	0,333333	0,333333	84,0989	99,7871	99,8914

Leyenda: * Resultados correspondientes a material fresco

Fuente: Elaboración propia

Una vez realizado el análisis estadístico del diseño planteado se observó que el software empleado (Design Expert versión 10), como es usual, arrojó posibles resultados óptimos en correspondencia con toda una serie de diferentes modelos matemáticos viables.

Para el caso de los resultados de actividad antioxidante obtenidos mediante el método FRAP, los mejores ajustes correspondieron al modelo lineal, tanto para los aceites extraídos a partir del material foliar fresco como seco. En el caso de los resultados de actividad antioxidante obtenidos a través del método del radical ABTS, el modelo de mejor ajuste resultó ser del tipo Especial Cuártico (Tabla 10 y Anexo 1).

Tabla 10. Coeficientes de determinación (R^2) para los modelos de mejor ajuste en cuanto a la actividad antioxidante evaluada

Método	R^2 ajustado	R^2 predicho
FRAP (material fresco)	0,9866	0,9812
ABTS (material fresco)	0,9990	0,9697
FRAP (material seco)	0,9810	0,9752

Fuente: Elaboración propia

Para cada modelo matemático obtenido, el valor de R^2 ajustado concordó razonablemente con el de R^2 predicho (Tabla 10), con una diferencia muy inferior a 0,2. La falta de ajuste resultó ser no significativa con un valor de $p > 0,05$, lo cual sugirió que los tres modelos fueron adecuados para los datos experimentales con un nivel de confianza del 95% (Anderson *et al.*, 2018).

Debido al elevado coeficiente de determinación encontrado, el modelo lineal propuesto para el caso de los aceites esenciales obtenidos a partir de material vegetal fresco y la evaluación de sus mezclas por el método FRAP, podrá ser posteriormente utilizado para evaluar el efecto estadístico de la composición de las mezclas de los aceites esenciales, sobre la base de la actividad antioxidante, expresada como miligramos equivalentes de TROLOX (Figura 2). El modelo de regresión para el experimento fue el siguiente (Anexo 2):

$$Y = 264,88*A + 7,25*B + 21,06*C$$

A-tomillo, B-cilantro y C-apio

6

Como se puede observar en la figura 2, el software empleado, a través del modelo matemático evaluado, propuso como óptima, dentro de las mezclas integradas por tres componentes, la que contenía un 79,2 % de *Thymus vulgaris* L. (tomillo), 10,3 % de *Coriandrum sativum* L. (cilantro) y 10,5 % de *Apium graveolens* L. (apio), con una actividad de 212,833 mg equivalentes de TROLOX.

En la tabla 11 se reflejan los cinco mejores resultados de mezclas en cuanto a actividad antioxidante. A pesar de que el primer lugar lo ocupó el aceite puro de *Thymus vulgaris* L., el propósito principal de la investigación estuvo encaminado a encontrar una mezcla con una elevada actividad antioxidante y que mejorara la funcionalidad y las características organolépticas de algunos alimentos.

Tabla 11. Mejores resultados en cuanto a actividad antioxidante de mezclas de aceites esenciales extraídos de material vegetal fresco (FRAP).

No.	<i>Thymus vulgaris</i> L.	<i>Coriandrum sativum</i> L.	<i>Apium graveolens</i> L.	FRAP
1	1	0	0	264,877
2	<u>0,792</u>	<u>0,103</u>	<u>0,105</u>	<u>212,833</u>
3	0,674	0,058	0,268	184,603
4	0,549	0,451	0	148,583
5	0,511	0	0,489	145,687

Fuente: Elaboración propia

Al comparar la actividad antioxidante de la mezcla seleccionada con la suma simple del aporte individual de cada componente a la actividad final, en la proporción propuesta, se observó un incremento del 7 %, lo que indicó una posible potenciación de la acción o sinergismo (Alonso, *et al.*, 1999).

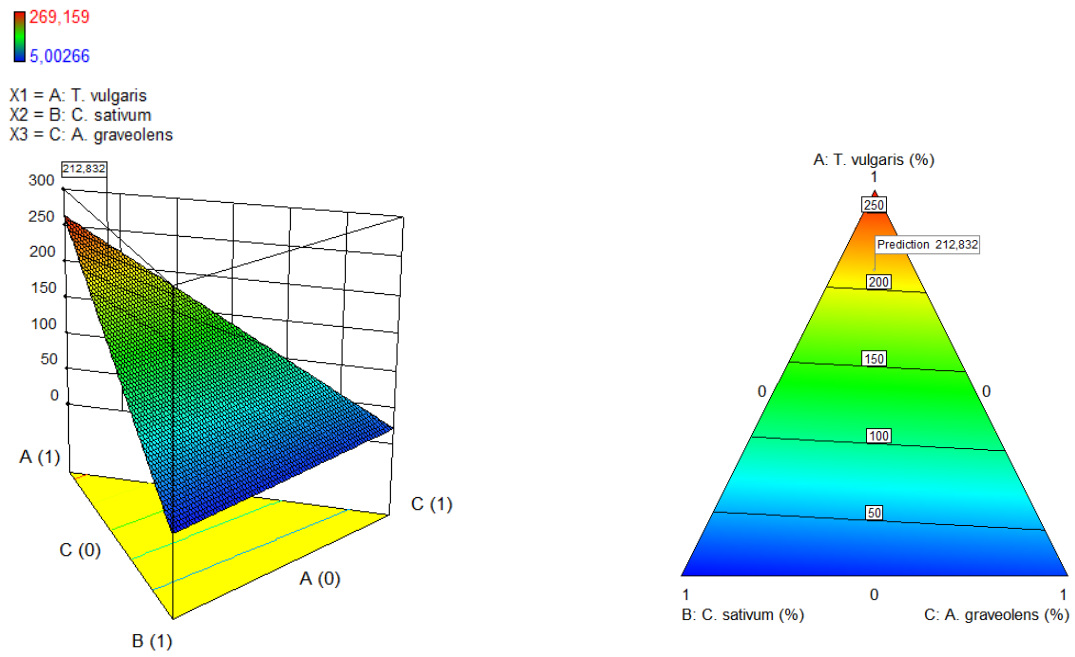


Figura 2. Modelo lineal de superficie de respuesta (FRAP fresco).

Para analizar la validez del modelo de regresión (Figura 3A), se realizó un análisis de residuo, el cual se muestra gráficamente (Figura 3B).

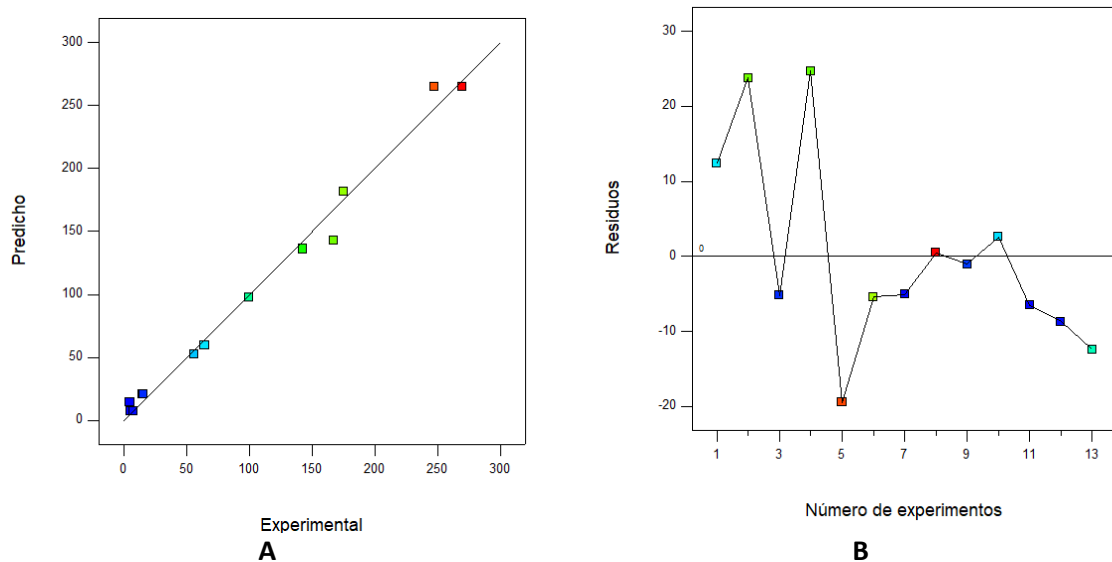


Figura 3. Correlación entre los valores experimentales y aproximados (A) y gráfico de los residuos vs. valores normales esperados (B).

Para las mezclas de aceites esenciales extraídos de material vegetal fresco, evaluados por el método ABTS, el coeficiente de determinación encontrado para el modelo Especial

Cuártico hallado es igualmente elevado (Tabla 10) y de igual manera podrá ser utilizado para evaluar el efecto de la composición de las mezclas de aceites esenciales, sobre la base de la actividad antioxidante (Figura 4). El modelo de regresión calculado para este experimento fue el siguiente (Anexo 2):

$$Y = 99,69*A+1,19*B+2,19*C+179,61*AB+190,80*AC \quad 7$$

En la figura 4 se puede apreciar que la mezcla de tres componentes propuesta como óptima fue en este caso: 72,6 % de *Thymus vulgaris* L. (tomillo), 0,6 % de *Coriandrum sativum* L. (cilantro) y 26,8 % de *Apium graveolens* L. (apio), con porcentaje de inhibición propuesto de 109,691 (Tabla 12).

Tabla 12. Mejores resultados de actividad antioxidante de mezclas de aceites esenciales extraídos de material vegetal fresco (ABTS).

No.	<i>Thymus vulgaris</i> L.	<i>Coriandrum sativum</i> L.	<i>Apium graveolens</i> L.	ABTS
1	0,718	0	0,282	110,818
2	0,7	0	0,3	110,506
3	<u>0,726</u>	<u>0,006</u>	<u>0,268</u>	<u>109,691</u>
4	0,67	0	0,33	109,683
5	0,863	0	0,138	108,908

Fuente: Elaboración propia

Esto puede explicarse, en primer lugar, porque a través de ambos métodos el programa propuso mezclas que, si bien guardan relación en cuanto a la abundancia relativa de cada componente, no tienen exactamente la misma composición. En segundo lugar, porque, aunque las dos técnicas de determinación de la actividad antioxidante: ABTS y FRAP se basan en reacciones de oxidación - reducción, las diferencias en las respuestas pueden deberse al pH del medio. En ABTS el pH es neutro mientras que en FRAP se ajusta el pH a 3,6; esto disminuye el potencial de ionización implicado en la transferencia de electrones, por lo que se incrementa el potencial “redox” y cambia el mecanismo de reacción dominante (Olaya & Restrepo, 2012).

Los resultados obtenidos concordaron con los informados recientemente para otras mezclas de aceites con actividad antioxidante y con potencial uso agroindustrial como aditivos alimentarios (Baj *et al.*, 2018).

En la figura 5 se observa la comparación de los datos empíricos con los aproximados a través de la cual se comprueba la validez del modelo de regresión (Figura 5A), y el análisis de residuo (Figura 5B).

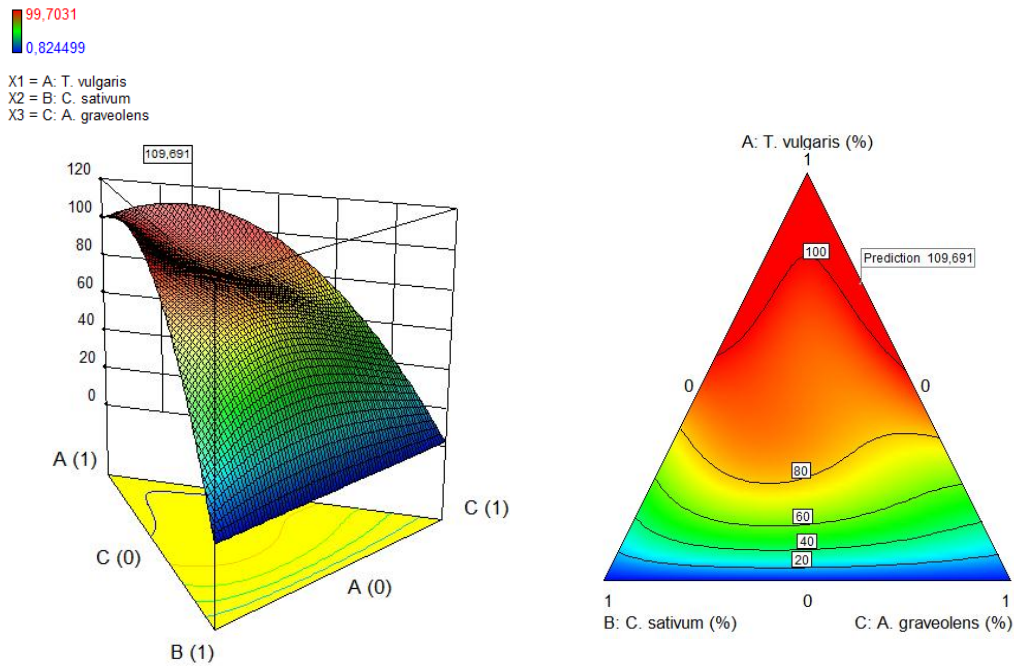


Figura 4. Modelo Especial Cuártico de superficie de respuesta (ABTS)

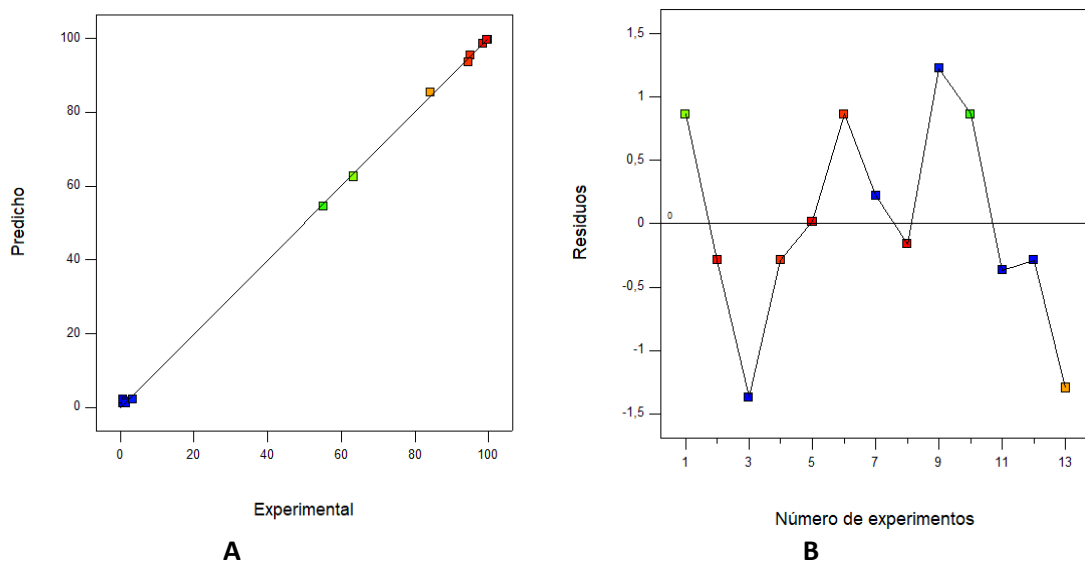


Figura 5. Correlación entre los valores experimentales y aproximados (A) y gráfico de los residuos vs. valores normales esperados (B).

Para los datos obtenidos a través de los métodos de determinación de la actividad antioxidante: FRAP y ABTS, para material vegetal fresco, se llevó a cabo un análisis de

regresión, con vistas a evaluar la correspondencia entre los resultados alcanzados (Figura 6). El modelo matemático que relaciona los resultados de los dos métodos resultó exponencial y el coeficiente de determinación ($R^2 = 0,9444$) indicó un ajuste adecuado.

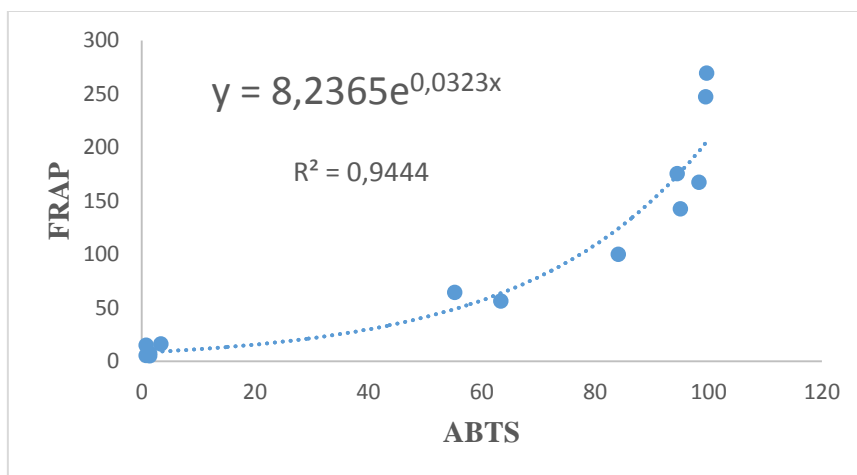


Figura 6. Relación entre los resultados de actividad antioxidante obtenidos por los métodos ABTS y FRAP

Finalmente, como se expresó en el Capítulo III, se evaluó la actividad antioxidante, por el método FRAP para el material vegetal seco con la intención de evaluar si se incrementa o no la actividad biológica esperada.

El modelo de regresión lineal propuesto para la evaluación de las mezclas de aceites esenciales (Figura 7), fue el siguiente (Anexo 2):

$$Y = 297,69 \cdot A + 14,05 \cdot B + 25,13 \cdot C$$

8

En este análisis la mezcla óptima de tres componentes propuesta fue: 79,3 % de *Thymus vulgaris* L. (tomillo), 10,3 % de *Coriandrum sativum* L. (cilantro) y 10,4 % de *Apium graveolens* L. (apio), una actividad de 239,962 mg equivalentes de TROLOX (Tabla 13 y Figura 7).

Tabla 13. Mejores resultados de actividad antioxidante de mezclas de aceites esenciales extraídos de material vegetal seco (FRAP).

No.	<i>Thymus vulgaris</i> L.	<i>Coriandrum sativum</i> L.	<i>Apium graveolens</i> L.	FRAP Seco
1	1	0	0	297,686
2	0,793	0,103	0,104	239,962
3	0,784	0,087	0,128	235,311
4	0,579	0,387	0,035	176,786
5	0,549	0,451	0	168,025
6	0,511	0	0,489	162,972

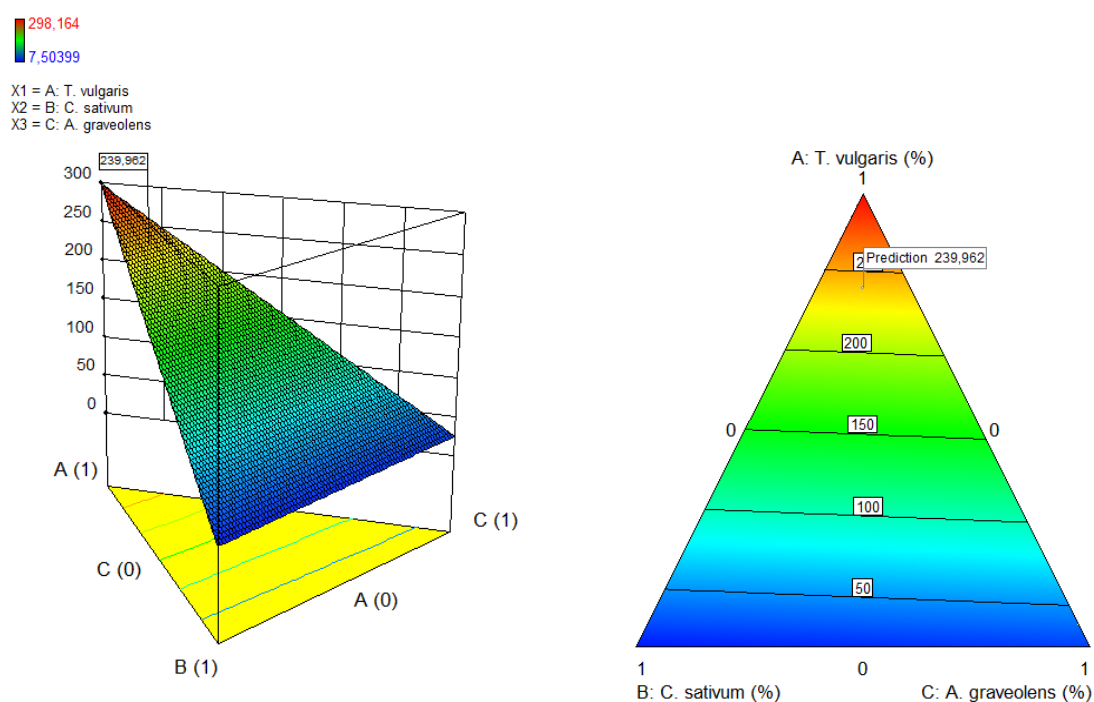


Figura 7. Modelo lineal de superficie de respuesta

Al igual que en el modelo obtenido para material vegetal fresco, el modelo lineal propuesto, para el caso de los aceites esenciales obtenidos a partir de material vegetal seco y la evaluación de sus mezclas por el método FRAP, podrá ser utilizado para evaluar el efecto de la composición de las mezclas, sobre la actividad antioxidante, expresada como miligramos equivalentes de TROLOX

En la figura 8 se ofrece una comparación de los datos empíricos con los aproximados, lo cual demuestra la validez del modelo de regresión (Figura 8A), y el análisis de residuo (Figura 8B).

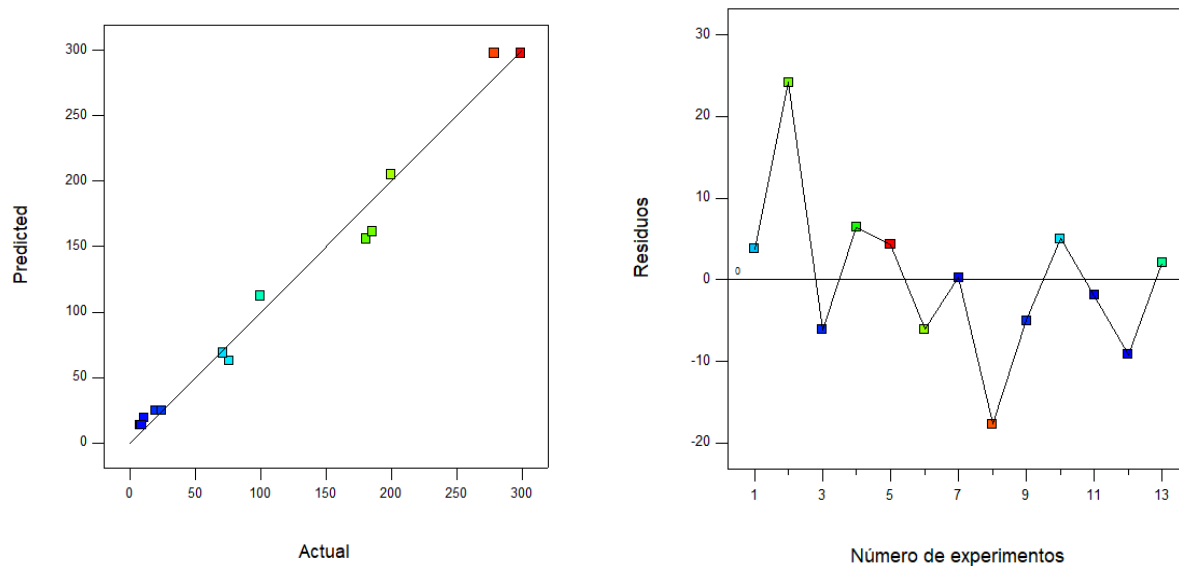


Figura 8. Correlación entre los valores experimentales y aproximados (A) y gráfico de los residuos vs. valores normales esperados (B).

Finalmente es importante resaltar que, en todos los casos, independientemente del tipo de material (seco o fresco) y el método empleado para la evaluación de la actividad antioxidante los resultados correspondientes a los puntos del diseño de mezclas para los cuales se evaluó un aceite puro permitieron establecer que el orden de actividad fue: *Coriandrum sativum* L. < *Apium graveolens* L. < *Thymus vulgaris* L.

CAPÍTULO V.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

1. Los rendimientos (%) obtenidos para los aceites esenciales de *Coriandrum sativum* L., *Apium graveolens* L. y *Thymus vulgaris* L. fueron mayores para material vegetal seco: 0,2247; 0,1268 y 0,3289, respectivamente, que para el fresco: 0,0425; 0,0178 y 0,3051, respectivamente. Para *Thymus vulgaris* L. los rendimientos fueron superiores a las otras dos especias.

2. Para los resultados de actividad antioxidante obtenidos mediante el método FRAP, los mejores ajustes correspondieron al modelo lineal, tanto para los aceites extraídos a partir del material foliar fresco como seco; para los obtenidos a través del método del radical ABTS, el modelo de mejor ajuste resultó ser del tipo especial cuártico.

3. Las mezclas optimizadas de los tres aceites esenciales: i.- 79,2 % de *T. vulgaris*; 10,3 % de *C. sativum* y 10,5 % de *A. graveolens*, para material fresco por FRAP, ii.- 72,6 % de *T. vulgaris*; 0,6 % de *C. sativum* y 26,8 % de *A. graveolens*, para material fresco por ABTS y iii.- 79,3 % de *T. vulgaris*; 10,3 % de *C. sativum* y 10,4 % de *A. graveolens*, para material seco por FRAP, se caracterizaron por presentar un porcentaje de aceite de *Thymus vulgaris* L., significativamente superior y se determinó que existía sinergia o potenciación de la actividad antioxidante en todos los casos.

5.2. RECOMENDACIONES

1. Emplear las mezclas optimizadas de aceites esenciales de *Coriandrum sativum* L., *Apium graveolens* L. y *Thymus vulgaris* L. como aditivos alimentarios para mejorar la funcionalidad y prolongar la vida útil de los alimentos.

2. Caracterizar los aceites esenciales obtenidos para cada especie vegetal y valorar la posible variabilidad en cuanto a composición química.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, P., Salucci, M., Lázaro, R., Malani, G., & Ferro-Luzzi, A. (1999). Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes antioxidantes de algunos alimentos. *Rev Cubana Alim Nutric*, 13(2), 104-111.
- Álvarez, E. Jiménez O., Posada, C., Rojano, B.A., Gil J.H., García C.M., Durango D.L., (2008). Actividad Antioxidante y Contenido Fenólico de los Extractos Provenientes de las Bayas de Dos Especies del Género *Vismia* (Guttiferae). *Revista De La Facultad De Química Farmacéutica*. ISSN 0121-4004 Volumen 15 número 1. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. págs. 165-172.
- Alzamora, L., Morales, L., Armas, L., & Fernández, G. (2001). Medicina tradicional en el Perú: Actividad antimicrobiana in vitro de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. In *Anales de la Facultad de Medicina* (Vol. 62, No. 2). Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Amorati, R., Foti, M. C., & Valgimigli, L. (2013). Antioxidant activity of essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(46), 10835-10847.
- Anderson, M. J., Whitcomb, P. J., & Bezener, M. A. (2018). *Formulation Simplified: Finding the Sweet Spot through Design and Analysis of Experiments with Mixtures*.
- Avello, M., & Pastene, E. (2005). Actividad antioxidante de infusos de *Ugni molinae Turcz* (Murtilla). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 4(2).
- Baj, T., Baryluk, A., Sieniawska, E., (2018). Application of mixture design for optimum antioxidant activity of mixtures of essential oils from *Ocimum basilicum* L., *Origanum majorana* L. and *Rosmarinus officinalis* L. *Industrial Crops & Products* 115, 52–61.
- Bajalan, I., Rouzbahani, R., Pirbalouti, A. G., & Maggi, F. (2017). Antioxidant and antibacterial activities of the essential oils obtained from seven Iranian populations of *Rosmarinus officinalis*. *Industrial Crops and Products*, 107, 305-311.
- Bayramoglu, B., Shanin, S. y Sumnu, G. (2008). Solvent-free microwave extraction of essential oil from oregano. *Journal of Food Engineering*. 88:535-540.
- Bousbia, N., Vian, M. A., Ferhat, M. A., Petitcolas, E., Meklati, B. Y., Chemat, F. (2009). Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves:

- hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food Chemistry*. 114:355-362.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Castañeda, M. I., Muñoz, A., Martínez, J. R., & Stanschenko, E. E. (2007). Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas. *Scientia et Technica*, 1(33).
- Cerutti, M., & Neumayer, F. (2004). Introducción a la obtención de aceite esencial de limón. *Invenio*, 7(12).
- Chávez, F., Aranda, M., García, A., & Pastene, E. (2011). Los polifenoles antioxidantes extraídos del epicarpio de Palta (*Persea americana* var. Hass) inhiben la ureasa de *Helicobacter pylori*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10(3).
- Cornell, J.A., (2011). *Experiments with mixtures: designs, models and the analysis of mixture data*, vol. 895 John Wiley & Sons, New York.
- Dorling, K. (2008). *RHS AZ Encyclopedia of garden plants*. United Kingdom, 1136.
- Ebrahimi, M., Khosravi-Darani, K., (2013). Essential oils as natural food preservatives: antimicrobial and antioxidant applications. In: Doughari, James (Ed.), *Antimicrobials from Nature: Effective Control Agents for Drug Resistant Pathogens*. Transworld Research Network, Kerala, India.
- Fazal, S. S., & Singla, R. K. (2012). Review on the pharmacognostical & pharmacological characterization of *Apium graveolens* Linn. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(1), 36-42.
- Goupy, J., Creighton, L., (2006). *Introduction aux plans d'expériences*. Tercera Edición. Dunod, Paris.
- Guija-Poma, E., Inocente-Camones, M. Á., Ponce-Pardo, J., & Zarzosa-Norabuena, E. (2015). Evaluación de la técnica 2, 2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horizonte Médico*, 15(1), 57-60.

- Guimaraes, R., Sousa, M.J., Ferreira, I.C.F.R., (2010). Contribution of essential oils and phenolics to the antioxidant properties of aromatic plants. *Ind. Crops Prod.* 32, 152–156.
- Hosseinzadeh, S., Jafarikukhdan, A., Hosseini, A., & Armand, R. (2015). The application of medicinal plants in traditional and modern medicine: A review of *Thymus vulgaris*. *International Journal of Clinical Medicine*
- Infoagro, (1997). Departamento de Ingeniería Agronómica y Contenidos. Coriandro, un cultivo alternativo para la producción de aceites (en línea). Murcia, España. Consultado 20 de enero 2010. Disponible en: <http://www.infoagro.com/aromaticas/cilantro.htm>
- Kaya, D. A., Arslan, M. E. H. M. E. T., & Rusu, L. C. (2013). Effects of harvesting hour on essential oil content and composition of *Thymus vulgaris*. *Farmacia*, 61(6), 1194–1203.
- Kooti, W., Ali-Akbari, S., Asadi-Samani, M., Ghadery, H., & Ashtary-Larky, D. (2015). A review on medicinal plant of *Apium graveolens*. *Advanced Herbal Medicine*, 1(1), 48–59.
- Kukula-Koch, W., Kędzierski, B., Głowniak, K., (2015). Influence of extrahent on antioxidant capacity of *Aesculus hippocastanum* seeds. *Nat. Prod. Res.* 29 (4), 370–373.
- Kukula-Koch, W., Koch, W., Angelis, A., Halabalaki, M., Aligiannis, N., (2016). Application of pH-zone refining hydrostatic countercurrent chromatography (hCCC) for the recovery of antioxidant phenolics and the isolation of alkaloids from Siberian barberry herb. *Food Chem.* 203, 394–401.
- Kukula-Koch, W., Mroczek, T., (2015). Application of hydrostatic CCC-TLC-HPLC-ESI-TOFMS for the bioguided fractionation of anticholinesterase alkaloids from *Argemone mexicana* L. Roots. *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (9), 2581–2589.
- Leos-Rivas, C., Rivas-Morales, C., & García-Hernández, D. (2016). Actividad antioxidante y toxicidad. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., & Verde-Star, M.J. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España: OmniaScience. 41-76.

- Maher Ali Ahmed, M., Saeed Mohammed, A. and Ebtesam Hasan, A. (2011) Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Thymus vulgaris* from Yemen. *Turkish Journal of Biochemistry*, **36**, 342-349.
- Marino, M. and Bersani, C. (1999). Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Thymus vulgaris* L. Measured Using a Bioimpedometric Method. *Journal of Food Protection*, **62**, 1017-1023.
- Martínez, M.A. (2003). "Aceites Esenciales". Universidad de Antioquia, p.p. 1-34.
- Medina de Días, R., Zimmermann, M., Dupertuis, L., Espejo, C., Amadio, C., Raimondo, E., & Dip, G. (2003). Aceite esencial de tomillo como antioxidante y conservador en hamburguesas funcionales. *Rev Fac Cienc Agr UNCuyo*, **35**, 13-23.
- Molina, J. B., Vanegas, P., & Martínez-Correa, H. A. (2016). Comparación entre métodos de extracción de aceite de semilla de zapallo (*Curcubita moschata*). *Agronomía Colombiana*, **34**(1Supl), S588-S590.
- Morales, J.P. (1995). FDA, Fundación de Desarrollo Agropecuario, Inc. Cultivo de cilantro, cilantro ancho y perejil. Boletín técnico N° 25 (en línea). República Dominicana. Consultado 15 de diciembre 2009. Disponible en: <http://www.rediaf.net.do/publicaciones/guias/download/cilantro.pdf>.
- Olaya Zea, J. A., & Restrepo Sánchez, L. P. (2012). Estudio del contenido de fenoles y actividad antioxidante de guayaba en diferentes estados de madurez. *Acta Biológica Colombiana*, **17**(3).
- Olmedo, R., Nepote, V., Grosso, N.R., (2012). Aguaribay and cedron essential oils as natural antioxidants in oil-roasted and salted peanuts. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **89** (12), 2195–2205.
- Peredo-Luna, H., Palou-García, E., López-Malo, A., (2009). Aceites esenciales: métodos de extracción. *Temas selectos de ingeniería de alimentos 3-1*. 24-32.
- Pulido, H. G., De La Vara Salazar, R., González, P. G., Martínez, C. T., & Pérez, M. D. C. T. (2012). *Análisis y diseño de experimentos*. McGraw-Hill.
- Rather, M. A., Dar, B. A., Dar, M. Y., Wani, B. A., Shah, W. A., Bhat, B. A., ... & Qurishi, M. A. (2012). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the

- leaf essential oil of *Juglans regia* L. and its constituents. *Phytomedicine*, 19(13), 1185-1190.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Shabnum, S., & Wagay, M. G. (2011). Essential oil composition of *Thymus vulgaris* L. and their uses. *Journal of Research & Development*, 11, 83-94.
- Sahib N.G., Anwar F., Gilani A.-H., Hamid A.A., Saari N., Alkharfy K.M. (2013). Coriander (*Coriandrum sativum* L.): A Potential Source of High-Value Components for Functional Foods and Nutraceuticals - A Review. *Phytotherapy Research*, 27(10): 1439-1456.
- Suhaj, M., (2006). Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *J. Food Compos. Anal.* 19, 531–537.
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., et al., (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants: antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem.* 91, 621–632.
- Santillán-Urquiza, E., Méndez-Rojas, M., & Vélez-Ruíz, J. (2014). Productos lácteos funcionales, fortificados y sus beneficios en la salud humana. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 8(1).
- Sirocchi, V., Devlieghere, F., Peelman, N., Sagratini, G., Maggi, F., Vittori, S., Ragaert, P., (2017). Effect of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil combined with different packaging conditions to extend the shelf life of refrigerated beef meat. *Food Chem.* 221, 1069–1076.
- Torres-Aguirre, G. A., Muñoz-Bernal, Ó. A., Álvarez-Parrilla, E., Núñez-Gastélum, J. A., Wall-Medrano, A., Sáyago-Ayerdi, S. G., & Laura, A. (2018). Optimización de la extracción e identificación de compuestos polifenólicos en anís (*Pimpinella anisum*), clavo (*Syzygium aromaticum*) y cilantro (*Coriandrum sativum*) mediante HPLC acoplado a espectrometría de masas. *Revista TIP*, 21(2), 103-115.
- Yolmeh, M., Khomeiri, M., & Ahmadi, Z. (2017). Application of mixture design to introduce an optimum cell-free supernatant of multiple-strain mixture (MSM) for

Lactobacillus against food-borne pathogens. LWT-Food Science and Technology, 83, 298-304.

ANEXO 1

FRAP fresco

ANOVA for Linear Mixture model

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob. > F	
Model	1,05E+05	2	52504,46	442,86	< 0.0001	significant
<i>Linear Mixture</i>	<i>1,05E+05</i>	<i>2</i>	<i>52504,46</i>	<i>442,86</i>	<i>< 0.0001</i>	
Residual	1185,58	10	118,56			
<i>Lack of Fit</i>	<i>941,66</i>	<i>7</i>	<i>134,52</i>	<i>1,65</i>	<i>0,3673</i>	<i>not significant</i>
<i>Pure Error</i>	<i>243,92</i>	<i>3</i>	<i>81,31</i>			
Cor Total	1,06E+05	12				

ABTS fresco

ANOVA for Special Quartic Mixture model

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob. > F	
Model	24182,9	8	3022,86	1561,81	< 0.0001	significant
<i>Linear Mixture</i>	<i>18196,19</i>	<i>2</i>	<i>9098,09</i>	<i>4700,68</i>	<i>< 0.0001</i>	
<i>AB</i>	<i>1627,45</i>	<i>1</i>	<i>1627,45</i>	<i>840,85</i>	<i>< 0.0001</i>	
<i>AC</i>	<i>1836,54</i>	<i>1</i>	<i>1836,54</i>	<i>948,88</i>	<i>< 0.0001</i>	
<i>BC</i>	<i>7,72E-05</i>	<i>1</i>	<i>7,72E-05</i>	<i>3,99E-05</i>	<i>0,9953</i>	
<i>A²BC</i>	<i>335,28</i>	<i>1</i>	<i>335,28</i>	<i>173,23</i>	<i>0,0002</i>	
<i>AB²C</i>	<i>333,98</i>	<i>1</i>	<i>333,98</i>	<i>172,56</i>	<i>0,0002</i>	
<i>ABC²</i>	<i>63,98</i>	<i>1</i>	<i>63,98</i>	<i>33,05</i>	<i>0,0045</i>	
Residual	7,74	4	1,94			
<i>Lack of Fit</i>	<i>4,2</i>	<i>1</i>	<i>4,2</i>	<i>3,55</i>	<i>0,1561</i>	<i>not significant</i>
<i>Pure Error</i>	<i>3,55</i>	<i>3</i>	<i>1,18</i>			
Cor Total	24190,65	12				

FRAP seco

ANOVA for Linear Mixture model

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob. > F	
Model	1,29E+05	2	64527,33	311,52	< 0.0001	significant
^L <i>Linear Mixture</i>	^L <i>1,29E+05</i>	^L <i>2</i>	^L <i>64527,33</i>	^L <i>311,52</i>	^L <i>< 0.0001</i>	
Residual	2071,34	10	207,13			
<i>Lack of Fit</i>	<i>1862,94</i>	<i>7</i>	<i>266,13</i>	<i>3,83</i>	<i>0,1486</i>	<i>not significant</i>
<i>Pure Error</i>	<i>208,4</i>	<i>3</i>	<i>69,47</i>			
Cor Total	1,31E+05	12				

ANEXO 2

FRAP fresco

Model Summary Statistics

	Std.		Adjusted	Predicted		
Source	Dev.	R-Squared	R-Squared	R-Squared	PRESS	
<u>Linear</u>	<u>10,89</u>	<u>0,9888</u>	<u>0,9866</u>	<u>0,9812</u>	<u>1995,74</u>	<u>Suggested</u>
Quadratic	8,43	0,9953	0,992	0,98	2125,06	
Special Cubic	8,44	0,996	0,992	0,9649	3727,01	
Cubic	7,89	0,9977	0,993	0,9827	1835,47	Aliased
Special Quartic	7,89	0,9977	0,993	0,9827	1835,47	
Quartic	9,02	0,9977	0,9908		+	Aliased

ABTS fresco

Model Summary Statistics

	Std.		Adjusted	Predicted		
Source	Dev.	R-Squared	R-Squared	R-Squared	PRESS	
Linear	24,48	0,7522	0,7026	0,5777	10214,65	
Quadratic	9,3	0,975	0,9571	0,9075	2237,63	
Special Cubic	9,45	0,9778	0,9557	0,66	8224,25	
Cubic	1,39	0,9997	0,999	0,9697	732,68	Aliased
<u>Special Quartic</u>	<u>1,39</u>	<u>0,9997</u>	<u>0,999</u>	<u>0,9697</u>	<u>732,68</u>	<u>Suggested</u>
Quartic	1,09	0,9999	0,9994		+	Aliased

FRAP seco

Model Summary Statistics

	Std.		Adjusted	Predicted		
Source	Dev.	R-Squared	R-Squared	R-Squared	PRESS	
<u>Linear</u>	<u>14,39</u>	<u>0,9842</u>	<u>0,981</u>	<u>0,9752</u>	<u>3250,98</u>	<u>Suggested</u>
Quadratic	12,98	0,991	0,9846	0,9539	6049,84	
Special Cubic	9,96	0,9955	0,9909	0,95	6554,68	
Cubic	8,16	0,998	0,9939	0,9183	10716,22	Aliased
Special Quartic	8,16	0,998	0,9939	0,9183	10716,22	
Quartic	8,33	0,9984	0,9936		+	Aliased