



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES
CARRERA DE AGRONOMÍA
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título:

**“PROCESO DE EXTRACCIÓN DE BIOACTIVOS DE PLANTAS EN
DOS ESPECIES VEGETALES (*Thymus vulgaris* L., *Mentha piperita*)
PARA CARACTERIZACIÓN CON ESPECTROMETRÍA ÓPTICA”**

Proyecto de Investigación presentado previo a la obtención del Título de
Ingeniero Agrónomo

Autor:
Yánez Zapata Alex Vinicio

Tutora:
Morillo Acosta Marcela Janine
Co - Tutora:
Diana Elizabeth Toapanta Gallegos

LATACUNGA – ECUADOR
Febrero 2023

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Yáñez Zapata Alex Vinicio, con cédula de ciudadanía No. 0503572067, declaro ser autor del presente proyecto de investigación: “Proceso de extracción de bioactivos de plantas en dos especies vegetales (*Thymus vulgaris* L., *Mentha piperita*) para caracterización con espectrometría óptica”, siendo la Astrónoma M.Sc. Marcela Janine Morillo Acosta, Tutora del presente trabajo; y, eximo expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Latacunga, 16 de febrero del 2023

Alex Vinicio Yáñez Zapata
Estudiante
CC: 0503572067

Astr. Marcela Janine Morillo Acosta, M.Sc.
Docente Tutora
CC: 1719994392

CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR

Comparecen a la celebración del presente instrumento de cesión no exclusiva de obra, que celebran de una parte **YÁNEZ ZAPATA ALEX VINICIO**, identificado con cédula de ciudadanía **0503572067** de estado civil soltero, a quien en lo sucesivo se denominará **EL CEDENTE**; y, de otra parte, el Doctor Cristian Fabricio Tinajero Jiménez, en calidad de Rector, y por tanto representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en la Av. Simón Rodríguez, Barrio El Ejido, Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará **LA CESIONARIA** en los términos contenidos en las cláusulas siguientes:

ANTECEDENTES: CLÁUSULA PRIMERA. - **EL CEDENTE** es una persona natural estudiante de la carrera de Agronomía, titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado “Proceso de extracción de bioactivos de plantas en dos especies vegetales (*Thymus vulgaris L.*, *Mentha piperita*) para caracterización con espectrometría óptica”, la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad; y, las características que a continuación se detallan:

Historial Académico

Inicio de la carrera: Marzo 2019 - Agosto 2019

Finalización de la carrera: Octubre 2022 – Marzo 2023

Aprobación en Consejo Directivo: 30 Noviembre del 2022

Tutor: Astrónoma M.Sc. Marcela Janine Morillo Acosta

Tema: “Proceso de extracción de bioactivos de plantas en dos especies vegetales (*Thymus vulgaris L.*, *Mentha piperita*) para caracterización con espectrometría óptica”.

CLÁUSULA SEGUNDA. - **LA CESIONARIA** es una persona jurídica de derecho público creada por ley, cuya actividad principal está encaminada a la educación superior formando profesionales de tercer y cuarto nivel normada por la legislación ecuatoriana la misma que establece como requisito obligatorio para publicación de trabajos de investigación de grado en su repositorio institucional, hacerlo en formato digital de la presente investigación.

CLÁUSULA TERCERA. - Por el presente contrato, **EL CEDENTE** autoriza a **LA CESIONARIA** a explotar el trabajo de grado en forma exclusiva dentro del territorio de la República del Ecuador.

CLÁUSULA CUARTA. - **OBJETO DEL CONTRATO:** Por el presente contrato **EL CEDENTE**, transfiere definitivamente a **LA CESIONARIA** y en forma exclusiva los siguientes derechos patrimoniales; pudiendo a partir de la firma del contrato, realizar, autorizar o prohibir:

- a) La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio institucional que se ajuste a ese fin.
- b) La publicación del trabajo de grado.
- c) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.
- d) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.

e) Cualquier otra forma de utilización del trabajo de grado que no está contemplada en la ley como excepción al derecho patrimonial.

CLÁUSULA QUINTA. - El presente contrato se lo realiza a título gratuito por lo que **LA CESIONARIA** no se halla obligada a reconocer pago alguno en igual sentido **EL CEDENTE** declara que no existe obligación pendiente a su favor.

CLÁUSULA SEXTA. - El presente contrato tendrá una duración indefinida, contados a partir de la firma del presente instrumento por ambas partes.

CLÁUSULA SÉPTIMA. - CLÁUSULA DE EXCLUSIVIDAD. - Por medio del presente contrato, se cede en favor de **LA CESIONARIA** el derecho a explotar la obra en forma exclusiva, dentro del marco establecido en la cláusula cuarta, lo que implica que ninguna otra persona incluyendo **EL CEDENTE** podrá utilizarla.

CLÁUSULA OCTAVA. - LICENCIA A FAVOR DE TERCEROS. - LA CESIONARIA podrá licenciar la investigación a terceras personas siempre que cuente con el consentimiento de **EL CEDENTE** en forma escrita.

CLÁUSULA NOVENA. - El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en la cláusula cuarta, constituirá causal de resolución del presente contrato. En consecuencia, la resolución se producirá de pleno derecho cuando una de las partes comunique, por carta notarial, a la otra que quiere valerse de esta cláusula.

CLÁUSULA DÉCIMA. - En todo lo no previsto por las partes en el presente contrato, ambas se someten a lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, Código Civil y demás del sistema jurídico que resulten aplicables.

CLÁUSULA UNDÉCIMA. - Las controversias que pudieran suscitarse en torno al presente contrato, serán sometidas a mediación, mediante el Centro de Mediación del Consejo de la Judicatura en la ciudad de Latacunga. La resolución adoptada será definitiva e inapelable, así como de obligatorio cumplimiento y ejecución para las partes y, en su caso, para la sociedad. El costo de tasas judiciales por tal concepto será cubierto por parte del estudiante que lo solicitare.

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga, a los 15 días del mes de febrero del 2023.

Alex Vinicio Yáñez Zapata
EL CEDENTE

Dr. Cristian Fabricio Tinajero Jiménez
LA CESIONARIA

AVAL DE LA TUTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

En calidad de Tutora del Proyecto de Investigación con el título:

“PROCESO DE EXTRACCIÓN DE BIOACTIVOS DE PLANTAS EN DOS ESPECIES VEGETALES (*Thymus vulgaris L.*, *Mentha piperita*) PARA CARACTERIZACIÓN CON ESPECTROMETRÍA ÓPTICA”, de Yánez Zapata Alex Vinicio, de la carrera de Ingeniería Agrónoma, considero que el presente trabajo investigativo es merecedor del Aval de aprobación al cumplir las normas, técnicas y formatos previstos, así como también ha incorporado las observaciones y recomendaciones propuestas en la Pre defensa.

Latacunga, 16 de febrero del 2023

Astr. Marcela Janine Morillo Acosta, M.Sc.

DOCENTE TUTORA

CC: 1719994392

AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

En calidad de Tribunal de Lectores, aprobamos el presente Informe de Investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi; y, por la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; por cuanto, el postulante: Yáñez Zapata Alex Vinicio, con el título del Proyecto de Investigación: “PROCESO DE EXTRACCIÓN DE BIOACTIVOS DE PLANTAS EN DOS ESPECIES VEGETALES (*Thymus vulgaris* L., *Mentha piperita*) PARA CARACTERIZACIÓN CON ESPECTROMETRÍA ÓPTICA”, ha considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto de sustentación del trabajo de titulación.

Por lo antes expuesto, se autoriza realizar los empastados correspondientes, según la normativa institucional.

Latacunga, 16 de febrero del 2023

Lector 1 (Presidenta)
Ing. Mercy Lucila Ilbay Yupa, Ph.D
CC: 0604147900

Lector 2
Ing. Carlos Javier Torres Miño, Ph.D.
CC: 0502329238

Lector 3
Ing. Wilman Paolo Chasi Vizuete, Mg.
CC: 0502409725

AGRADECIMIENTO

Quiero empezar agradeciendo a Dios quien me ha dado sabiduría e inteligencia día tras día. Así mismo hacer un reconocimiento especial a toda mi familia por el apoyo incondicional, quienes han estado siempre presentes apoyándome durante toda mi carrera, y desde luego a la Astr. Marcela Morillo M.Sc., mi tutora, por su apoyo incondicional en la realización del proyecto. También expresar gratitud a los ingenieros: Diana Toapanta y Carlos Reinoso PH.D quienes han contribuido con sus ideas en todo el proceso para la realización de la investigación. Además, agradecer a la Universidad de Yachay Teach por el uso de su laboratorio y equipos.

Y finalmente a mi querida Universidad Técnica de Cotopaxi que me abrió sus puertas para que me pueda formar como profesional.

Alex Vinicio Yáñez Zapata

DEDICATORIA

El presente proyecto de investigación se le dedico a mis queridos padres: Vinicio Yánez y Meri Zapata por su amor incondicional, por sus palabras de aliento, por ser mi apoyo, por sus esfuerzos y sacrificios, inculcándome que todo sacrificio tiene su recompensa, han sido mi motor para cumplir esta meta que es terminar con mis estudios superiores y convertirme en un profesional.

A mis dos hermanas por ser el ente primordial en mi vida, que han estado en los momentos buenos y malos. Que siempre creyeron en mí, con sus palabras de aliento me motivaron para seguir creciendo como persona y profesional.

Alex

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

TÍTULO: “PROCESO DE EXTRACCIÓN DE BIOACTIVOS DE PLANTAS EN DOS ESPECIES VEGETALES (*Thymus vulgaris* L., *Mentha piperita*) PARA CARACTERIZACIÓN CON ESPECTROMETRÍA ÓPTICA”,

AUTOR: Yánez Zapata Alex Vinicio

RESUMEN

El presente trabajo de investigación es una secuencia de tres proyectos realizados anteriormente en la Universidad Técnica de Cotopaxi 2021-2022, donde se identifica mediante revisión bibliográfica una posible relación entre factores astronómicos y meteorológicos y su influencia en la fenología de las plantas. De lo anterior mencionado, se determinaron algunos bioactivos para posible estudio y búsqueda de las relaciones planteadas. Se tomó en cuenta el análisis bibliográfico y los bioactivos propuestos para continuar con la siguiente investigación. El trabajo actual tiene como objetivo desarrollar un proceso de extracción de bioactivos de plantas en dos especies vegetales, tomillo y menta piperita, para caracterización con espectrometría óptica. Se ubicaron las dos especies vegetales bajo condiciones de campo Urcuquí, Imbabura, para después seleccionar muestras de material vegetal para análisis de bioactivos. Se usaron tres procedimientos de extracción de bioactivos mediante la técnica de muestra simple (procedimiento uno) y de disrupción celular llamado bath sonicator y tip sonicator (correspondiente a los procedimientos dos y tres), para luego, evaluar por espectrometría óptica UV-VIS y RAMAN. La investigación se realizó con el apoyo de la Universidad Yachay Tech en convenio interinstitucional. Como conclusión, se logró obtener concentraciones de bioactivos, siendo el procedimiento 3 el más óptimo con condiciones: uso de disruptor celular (tip sonicator) por 5 minutos. Los procedimientos planteados están ajustados a condiciones propias e identificando los instrumentos disponibles. Este proyecto representa un primer paso para identificación de bioactivos mediante espectrometría óptica en las especies determinadas, para en un futuro estudiar sus espectros en diferentes condiciones de laboratorio y campo.

Palabras clave: Bioactivos, Espectrometría óptica, Disrupción celular, RAMAN.

TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI
FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCE AND NATURAL RESOURCES

THEME: “PROCESS OF EXTRACTION OF BIOACTIVES FROM PLANTS IN TWO PLANT SPECIES (*Thymus vulgaris L.*, *Mentha piperita*) FOR CHARACTERIZATION WITH OPTICAL SPECTROMETRY”

AUTHOR: Yánez Zapata Alex Vinicio

ABSTRACT

This research is a sequence of three projects previously carried out at the Technical University of Cotopaxi 2021-2022, where possible studies of astronomical and meteorological factors related to the influence on plant phenology are identified through a bibliographic review. From the above mentioned, some bioactives were determined to study the proposed relationships. The bibliographical analysis and the bioactives of the previous projects were taken into account to continue with the subsequent investigation. The work aims to develop a process for extracting bioactive from plants in two plant species, thyme and peppermint, for characterization with optical spectrometry where the two species were conditioned under field conditions Urcuqui, Imbabura, to later select samples of plant material for analysis of bioactive. In addition, to test bioactive extraction methods using the simple technique (procedure one) and cell disruption called bath sonicator and tip sonicator (corresponding to procedures two and three) for UV-VIS and RAMAN optical spectrometry evaluation. The research was carried out at Yachay Tech University. In conclusion, it was possible to obtain concentrations of bioactive, procedure three being the most optimal with conditions: cell disruptor for 5 minutes in tip sonicator. This methodology is proposed since it has been adjusted to its conditions and identifies the available instruments. This project represents a first step for identification of bioactives by optical spectrometry in the determined species, in order to study their spectra in different laboratory and field conditions in the future.

Keywords: Bioactives, Optical spectrometry, Cell disruption, RAMAN.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN DE AUTORÍA	ii
CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR.....	iii
AVAL DE LA TUTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	v
AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	vi
AGRADECIMIENTO	vii
DEDICATORIA.....	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	xi
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiii
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xiv
ÍNDICE DE IMÁGENES.....	xiv
1. INFORMACIÓN GENERAL	1
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO	2
3. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.....	2
4. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	3
5. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	3
6. OBJETIVOS.....	5
6.1 Objetivo General.....	5
6.2 Objetivos Específicos	5
7. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS	6
8. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA.....	7
8.1 Componentes Bioactivos de las plantas.....	7
8.2 Melatonina	8

8.2.1	Melatonina en plantas	8
8.3	Especies vegetales.....	11
8.3.1	Tomillo	11
8.3.2	Mentha piperita.....	12
8.4	Espectro electromagnético	14
8.5	RAMAN.....	16
8.6	Espectroscopía Óptica.....	18
9.	VALIDACIÓN DE LAS PREGUNTAS CIENTÍFICAS O HIPÓTESIS	18
10.	METODOLOGÍA.....	19
10.1	Definición del problema.....	30
10.2	Planificación.....	31
10.3	Desarrollo.....	31
10.3.1	Búsqueda de métodos de extracción de bioactivos de plantas	31
10.3.2	Visitas de campo.....	31
10.3.3	Laboratorio	31
10.3.4	Invernadero.....	34
10.4	Proceso de extracción mediante homogenización y disrupción celular	39
10.5	Finalización	40
11.	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	40
12.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	44
13.	BIBLIOGRAFÍA	45
14.	ANEXOS	47
	Sin anexos.....	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actividades y sistema de tareas en relación a los objetivos planteados.	6
Tabla 2. Características importantes del cultivo de tomillo.	12
Tabla 3. Características importantes del cultivo de menta.	14
Tabla 4. El espectro electromagnético abarca las siguientes regiones: ondas de baja y radiofrecuencia, microondas, infrarrojo, visible, ultravioleta, rayos X y rayos Gamma.....	16
Tabla 5. PROCEDIMIENTO 1 – MUESTRA SIMPLE	19
Tabla 6. PROCEDIMIENTO 2 – MUESTRA + NANOPARTÍCULAS AuQ.....	24
Tabla 7. PROCEDIMIENTO 3 – TIP SONICATOR	27
Tabla 8. Equipos del laboratorio de Física de la Universidad Yachay Tech de La Escuela de Ciencias Físicas y Nanotecnología.	31
Tabla 9. Trabajo en campo realizado con las dos especies vegetales (<i>Thymus vulgaris</i> L., <i>Mentha piperita</i>):.....	35

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Precipitaciones para el cantón Urcuquí	34
---	----

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Estructura de la Melatonina	9
Imagen 2. Rutas de las vías de biosíntesis de la Melatonina descritas en plantas con las enzimas que catalizan la transformación de sus intermediarios.	10
Imagen 3. Espectro Electromagnético	15
Imagen 4 Longitud de onda de excitación de carotenoides en tomates mediante espectroscopía RAMAN	17

1. INFORMACIÓN GENERAL

Título:

“Proceso de extracción de bioactivos de plantas en dos especies vegetales (*Thymus vulgaris* L., *Mentha piperita*) para caracterización con espectrometría óptica”.

Fecha de inicio:

Octubre 2022

Fecha de Finalización:

Febrero 2023

Lugar de ejecución:

Universidad Yachay Tech, Urcuquí, Imbabura.

Facultad Académica que auspicia:

Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales

Carrera que auspicia:

Agronomía

Nombres de equipo de investigadores:

Tutora: M.Sc. Marcela Morillo Acosta

Responsable del Proyecto: Alex Vinicio Yáñez Zapata

Lector 1: Ing. Mercy Lucila Ilbay Yupa, Ph.D

Lector 2: Ing. Carlos Javier Torres Miño, Ph.D.

Lector 3: Ing. Wilman Paolo Chasi Vizúete, Mg.

Área de Conocimiento:

Agronomía, Astronomía, Física óptica.

Línea de investigación:

Análisis, conservación y aprovechamiento de la biodiversidad local.

Sub línea de investigación de la Carrera:

Caracterización de la biodiversidad.

2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

En el presente trabajo de investigación se pretende determinar un proceso de extracción de bioactivos de plantas en dos especies vegetales tomillo y menta piperita (*Thymus vulgaris L.*, *Mentha piperita*) para su caracterización con espectrometría óptica e identificar su comportamiento. Los equipos están disponibles en el laboratorio de la Escuela de Ciencias Físicas de la Universidad Yachay Tech ubicado en San Miguel de Urququí.

Para identificar procesos de extracción de bioactivos de plantas, se procede con el reconocimiento del funcionamiento de dos equipos de espectrometría óptica: UV-VIS y RAMAN en las dos especies vegetales mediante mediciones de prueba. Con estos resultados y apoyo bibliográfico, se trabajará en posibles formas de extracción de bioactivos, para luego obtener los espectros de compuestos de cada una de las especies (*Thymus vulgaris L.*, *Mentha piperita.*), considerando los aspectos de: condiciones de laboratorio para el equipo UV-VIS y RAMAN, tiempo para la toma de muestras, cantidad por muestra y tipo de muestras por tomar (hoja, tallo, fruto).

3. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Esta investigación es una secuencia de trabajo de tres proyectos de investigación realizados anteriormente en la Universidad Técnica de Cotopaxi 2021 – 2022, donde identifican mediante revisión bibliográfica posibles estudios de factores astronómicos y meteorológicos que se relacionen con la influencia en la fenología de las plantas. En el trabajo de titulación (Sosa, 2022) se generó una propuesta metodológica que identifica tres fases de laboratorio para generar una base de datos de espectros de bioactivos en las dos especies vegetales (*Thymus vulgaris L.*, *Mentha piperita.*) bajo diferentes condiciones de laboratorio y campo. Una vez

identificados estos bioactivos, se puede trabajar en una posible relación entre éstos y factores astronómicos.

Con lo antes mencionado, el siguiente proyecto de investigación tiene como objetivo principal desarrollar la FASE 1 de la propuesta metodológica para el estudio de bioactivos en dos especies vegetales. Debido a los altos costos de laboratorio que representa usar HPLC (cromatografía líquida) para separar los componentes de plantas, se usará espectrometría óptica en equipos UV-VIS y RAMAN disponibles en los laboratorios de la Escuela de Ciencias Físicas de la Universidad Yachay Tech. El uso de estos instrumentos por convenio entre instituciones, no presentan costo alguno. Además, son tecnologías relativamente nuevas que se usarán en temas de Agronomía.

El proceso está sustentado con documentación bibliográfica obtenida de fuentes secundarias. El primer paso es conocer el funcionamiento del espectrómetro UV-VIS y RAMAN en las dos especies vegetales (*Thymus vulgaris L.*, *Mentha piperita.*) mediante mediciones de prueba de bioactivos, durante tres días consecutivos, una vez por mes, total tres meses. Se instaló un vivero en la Universidad Yachay Tech con las especies vegetales para su adaptación al medio. Con estos resultados y apoyo bibliográfico, se realizará la obtención de los espectros de cada una de las especies (*Thymus vulgaris L.*, *Mentha piperita.*) en una segunda etapa, considerando los aspectos de: condiciones de laboratorio para el equipo UV-VIS y RAMAN, tiempo para la toma de muestras, cantidad por muestra y tipo de muestras por tomar (hoja, tallo, fruto). Dependiendo de los resultados obtenidos en la fase de prueba está sujeto a modificaciones.

4. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Dentro de los beneficiarios del presente proyecto de investigación se puede enumerar los siguientes: Estudiantes de la carrera de Agronomía, Investigadores, Comunidad científica en Agronomía y Física Óptica.

5. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Esta investigación es una secuencia de trabajo de tres proyectos de investigación realizados anteriormente en la Universidad Técnica de Cotopaxi 2021 – 2022, donde identifican mediante revisión bibliográfica posibles estudios de factores astronómicos y meteorológicos que se

relacionen con la fenología de las plantas y exposición a factores de estrés. Mediante literatura se identificaron fitohormonas que posiblemente tengan relación con la luminosidad de los astros y éstas puede ser estudiada mediante espectroscopía óptica. Debido a los altos costos de laboratorio que representa usar HPLC (cromatografía líquida) para separar los componentes de plantas, se usará espectrometría óptica en equipos UV-VIS y RAMAN disponibles en los laboratorios de la Escuela de Ciencias Físicas de la Universidad Yachay Tech para el estudio de los bioactivos de las plantas.

La fase 1 es medir bioactivos (para luego encontrar fitohormonas) mediante los espectrómetros UV-VIS y RAMAN en las especies vegetales tomillo y menta piperita (*Thymus vulgaris L.*, *Mentha piperita*) a las siete semanas de desarrollo.

Para esta fase no se posee un protocolo de extracción de bioactivos por medio de espectroscopía Raman para especies vegetales. En este trabajo se pretende obtener procesos de extracción de bioactivos para caracterización con espectrometría óptica.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Desarrollar un proceso de extracción de bioactivos de plantas en dos especies vegetales tomillo y menta piperita (*Thymus vulgaris L.*, *Mentha piperita*) para caracterización con espectrometría óptica.

6.2 Objetivos Específicos

- Acondicionar las especies vegetales tomillo y menta piperita (*Thymus vulgaris L.*, *Mentha piperita*) bajo condiciones de campo Urcuqui, Imbabura.
- Identificar y seleccionar muestras de material vegetal para análisis de bioactivos de plantas con espectrometría RAMAN.
- Probar métodos de extracción de bioactivos de las dos especies vegetales tomillo y menta piperita (*Thymus vulgaris L.*, *Mentha piperita*) mediante la técnica de disrupción celular, para su evaluación por espectrometría óptica UV-VIS y RAMAN.

7. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS

Tabla 1. Actividades y sistema de tareas en relación a los objetivos planteados.

OBJETIVO	ACTIVIDAD	RESULTADO	MEDIO DE VERIFICACIÓN
<ul style="list-style-type: none"> Acondicionar las especies vegetales tomillo y menta piperita (<i>Thymus vulgaris L.</i>, <i>Mentha piperita</i>) bajo condiciones de campo Urcuqui, Imbabura. 	Implementación de las dos especies (Tomillo, Menta Piperita) dentro del vivero en Yachay Tech - Urcuquí. Manejo y control de las dos especies (Tomillo, Menta Piperita) dentro del vivero en Yachay Tech - Urcuquí.	<ul style="list-style-type: none"> Especies implementadas y controladas 	Libro de campo Fotografías
<ul style="list-style-type: none"> Identificar y seleccionar muestras de material vegetal para análisis de bioactivos de plantas con espectrometría RAMAN. 	Procedimiento 1: Toma de muestras simples.	<ul style="list-style-type: none"> Muestras vegetales para uso en RAMAN Identificación de muestra 	Procedimiento 1
<ul style="list-style-type: none"> Probar métodos de extracción de bioactivos de las dos especies vegetales tomillo y menta piperita (<i>Thymus vulgaris L.</i>, <i>Mentha piperita</i>) mediante la técnica de disrupción celular, para su evaluación por espectrometría óptica UV-VIS y RAMAN. 	Procedimiento 2: Extracción de muestra + Nano partículas AuQ + Bath sonicator. Procedimiento 3: Extracción de muestra + Tip sonicator. <ul style="list-style-type: none"> Uso de centrifugación. Medición de espectros en RAMAN. Medición de espectros en UV-VIS. 	<ul style="list-style-type: none"> Procesos de extracción para caracterización con espectrometría óptica. 	Procedimiento 2 y 3

Fuente: Autor

8. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA

8.1 Componentes Bioactivos de las plantas

Componentes de las plantas que influyen en la actividad celular y en los mecanismos fisiológicos. Estos miles de componentes se caracterizan por estar presentes en el reino vegetal y se encuentran agrupados en los alimentos y en ocasiones un determinado bioactivo se localiza específicamente en un pequeño grupo o familia vegetal. Es por eso la importancia del consumo variado de este amplio grupo de alimentos vegetales. (Carbajal, 2013)

Estas sustancias o componentes bioactivos o metabolitos secundarios de procedencia vegetal se denominan también fitoquímicos o fitonutrientes. Gracias a sus importantes y beneficiosas propiedades, efectos biológicos y a sus atributos sensoriales, actualmente ocupan un área de investigación emergente y con un gran futuro, dada la enorme variedad de alimentos y especies vegetales que los contienen. En el reino vegetal, se pueden diferenciar 4 grandes grupos de compuestos bioactivos, entre los que se incluyen sustancias de diversas familias químicas, como son las sustancias nitrogenadas, las azufradas, las terpénicas y, las más ampliamente estudiadas, las fenólicas. (Martínez et al., 2008)

Existe una operación clásica muy utilizada en las industrias farmacéutica, cosmética y de alimentos que corresponde a la extracción de compuestos bioactivos a partir de fuentes naturales. Los métodos que se implementan tradicionalmente tales como la extracción con disolventes, la destilación a vapor, con alta presión hidrostática elevada y a contracorriente se caracterizan por el uso de gran cantidad de disolvente, extensos tiempos de extracción, bajos rendimientos y un gran consumo de energía que afecta a la salud humana y al medio ambiente. También las condiciones de alta presión y temperaturas utilizadas afectan, en algunos casos, la calidad de los extractos o destruyen el componente activo. (Rodríguez et al., 2014)

Siendo este trabajo parte de un proyecto para la identificación de melatonina, a continuación se la describe:

8.2 Melatonina

La Melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) corresponde a una molécula de bajo peso molecular, a la que se atribuyen numerosas actividades biológicas, se encuentra presente tanto en organismos procariotas como eucariotas. (González, 2020)

Descubrimiento

Las primeras señales de vida de una sustancia segregada por la glándula pineal se supieron en 1917. Al nutrir renacuajos con un extracto de dicha glándula, salieron manchas oscuras en la piel de estos animales, por la contracción de los melanóforos. Aparece la sustancia, a la que se le dio el nombre de melatonina (N-acetil-5- metoxitriptamina), que fue separada por primera vez en 1958, cuarenta y un años después. (Illnait-Ferrer, 2012)

Biosíntesis de la Melatonina

En la síntesis de melatonina, las células de la glándula pineal atrapan triptófano de la sangre y, por un proceso de hidroxilación y decarboxilación, lo transforman en serotonina. Posteriormente, se convierte en N-acetilserotonina por causa de la N-acetiltransferasa, que después es metilada, en una reacción catalizada por la enzima hidroxilindol-O-metiltransferasa, para dar lugar a la melatonina. (Poza et al., 2022)

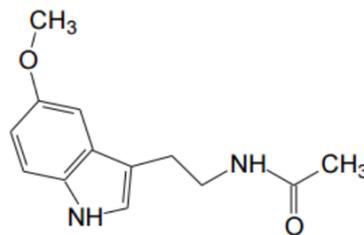
8.2.1 Melatonina en plantas

La melatonina es una molécula sumamente conservada que no solo se encuentra presente en los animales, sino que también está presente en las bacterias, los organismos unicelulares y las plantas. La melatonina es un antioxidante, en las plantas se examinó que la melatonina las protege del estrés oxidativo intrínseco y ambiental. Más importante aún, la melatonina en las

plantas comestibles ineludiblemente ingresa a los animales y humanos a través de los alimentos. (Chen et al., 2003)

La melatonina es una hormona denominada científicamente como N-acetil-5-metoxitriptamina. Es una indolamina, es decir, un compuesto que tiene un grupo amino y que deriva del indol. Pertenece a la familia de los metoxiindoles, los cuales son sintetizados a partir del triptófano. (De La Torre, 2016)

Imagen 1. Estructura de la Melatonina



Fuente: (De La Torre, 2016)

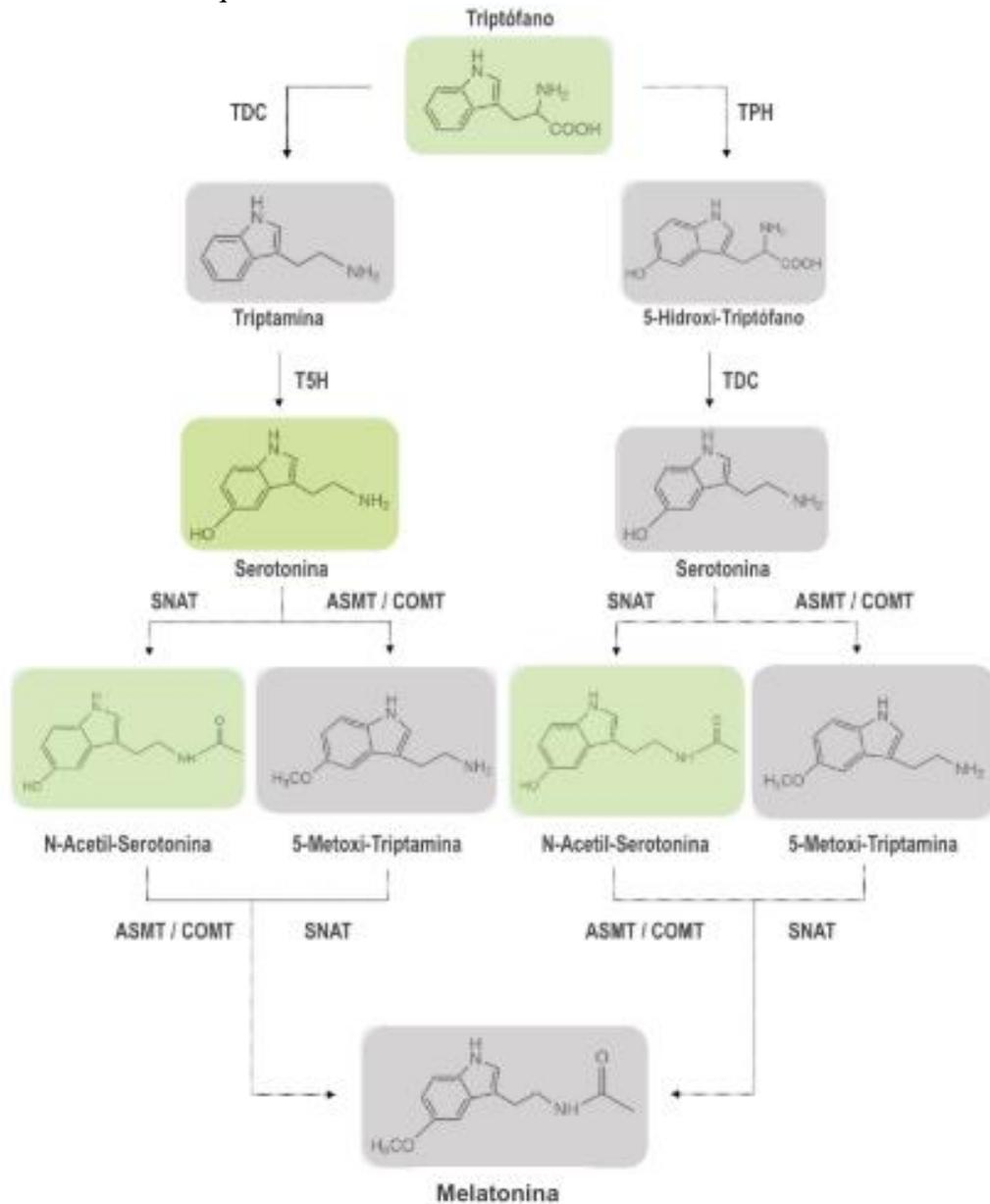
Actualmente, se conoce que la melatonina trabaja en diversas funciones fisiológicas en las plantas, a partir de la germinación de semillas hasta el almacenamiento de frutos. (Xu et al., 2019 como se citó en Back, 2021)

Biosíntesis de la melatonina

El precursor de la biosíntesis de la Melatonina es el aminoácido triptófano, en una ruta que para las especies vegetales requiere simplemente cuatro pasos. El primer paso es la transformación del Triptófano mediante una descarboxilación en Triptamina, que en una segunda reacción y mediante una hidroxilación, genera Serotonina. Estos dos pasos generan la ruta principal de producción de serotonina en plantas, si bien en algunas especies el Triptófano sufre previamente la hidroxilación y posteriormente la descarboxilación, en un proceso similar al observado en las células animal. La Serotonina, es obtenida en N-acetil-serotonina, reacción que en plantas puede ser catalizada por dos enzimas diferentes. El último paso, supone la obtención de la

Melatonina a partir de la N-acetil-serotonina, transformación que puede llevarse a cabo de nuevo por dos enzimas diferentes. Existe una variante en la biosíntesis de Melatonina en plantas, la cual utiliza el sustrato 5-metoxi- triptamina, generado a partir de la Serotonina, al igual que una reacción reversible entre la N-acetil-serotonina la Serotonina. (González, 2020)

Imagen 2. Rutas de las vías de biosíntesis de la Melatonina descritas en plantas con las enzimas que catalizan la transformación de sus intermediarios.



Fuente: (González, 2020)

8.3 Especies vegetales

8.3.1 Tomillo

El tomillo es procedente de la cuenca mediterránea de países como Italia, Grecia, sur de España, sur de Francia y norte de África. Al inicio se usaba solamente como una hierba aromática en la elaboración de los alimentos. Posteriormente los romanos lo utilizaban para combatir la tos y los egipcios como unguento para embalsamar a sus momias. Fue en el siglo XI que se cultivó y se extendió en toda Europa, llegando a México con la Conquista. En el presente es una de las plantas medicinales más conocidas y utilizadas en el mundo. (P. Castro, 2015)

El tomillo (*Thymus vulgaris* L.), es una especie que conforma a la familia *Lamiaceae*, que se distribuye en fresco o seco, principalmente para la obtención de su aceite esencial, que se encuentra en mayor cantidad en las hojas. (Gimeno, 2001)

Es una especie aromática, cuyo empleo está aumentando a ritmos que duplican o triplican el crecimiento de la población mundial, generado en gran medida por el uso del aceite esencial en las industrias alimenticia, cosmética y farmacéutica. (Gimeno, 2001)

Formas de propagación.

Los métodos más importantes de multiplicación del tomillo son por semilla o vegetativamente, por división de pies o por esquejes.

Se puede realiza la siembra de la semilla directamente al suelo. Si se siembra en vivero, las plántulas se deben trasplantar cuando tengan unos 8 cm de altura, aproximadamente a los 40 días de la emergencia, se recomienda en días nublados o a la caída de la tarde, humedeciendo la superficie del terreno antes del trasplante. (P. Castro, 2015)

Tabla 2. Características importantes del cultivo de tomillo.

Nombre Común	Tomillo limonero.
Familia	Lamiaceae.
Descripción	El tomillo es una hierba erecta de 40 cm muy ramificada, con ramificaciones leñosas y pubescentes; dispone de hojas opuestas de forma variada, frecuentemente obovado-lanceoladas hasta lanceoladas-estrechas de 3 a 6 mm de largo y 1-3 mm de ancho, pubescentes y de borde entero; la inflorescencia es verticilada de pocas flores color púrpura.
Distribución	Propia de la región Mediterránea y cultivada en Europa, Asia y América.
Usos	Fuertemente aromática. Además de usarse como condimento, sirve como antiséptico en úlceras y heridas, y en infusión contra la bronquitis, la laringitis y como antidiarreico. Combate infecciones y puede calmar migrañas.

Fuente: (D. Castro et al., 2013)

Elaboración: Autor

8.3.2 *Mentha piperita*

El nombre del género *Mentha* viene del latín *mintha* o *menta*, nombre de una ninfa de la mitología griega, hija de Cocito (humo del infierno), amada por Plutón (Ades) y a quien por celos de Proserpina, la convirtieron en una planta de menta. El epíteto *piperita* se describe a su sabor picante. (Quispe, 2016)

Con relación a su hábitat y comercialización es oriunda de Europa, pero se puede hallar con facilidad a lo largo de todo el mundo, escogiendo los climas templados a los calurosos o fríos. Es una planta que se puede cultivar en huertos, jardines o campos, crece espontáneamente en tierras profundas, ricas en humus y con mucha humedad. (Quispe, 2016)

Es una especie de planta muy manejada desde tiempos remotos, como droga seca y en forma de tintura, agua de menta, aceite esencial puro, mentol y sus derivados, ayuda en el tratamiento de enfermedades respiratorias, estomacales y del hígado, problemas cardíacos y la hipertensión; específicamente el aceite y el mentol poseen propiedades antisépticas y antiespasmódicas. Se utiliza además en la industria de cosméticos y alimentos. (Sánchez et al., 1996)

Aspectos agronómicos

Desde el punto de vista botánico es un híbrido de *Mentha aquatica* L. y *Mentha spicata* L. Se reproduce por medio de estolones y plantines; puede crecer ya sea en forma espontánea, o en terrenos baldíos, escombros, suelos ricos, húmedos, bien drenados y soleados, parques, etc, en zonas de clima templado que presente una elevada luminosidad. Es un cultivo que no es exigente, aunque es importante regar con frecuencia y desaparecer las malezas porque algunas pueden afectar la calidad de la producción. (Ministerio de Salud de Chile, 2019)

Se recomienda para el cultivo hacerlo en macetas o en el jardín, crece muy bien en suelo rico en materia orgánica y algo húmedo; si en el jardín va a estar alado de otras plantas, es mejor plantarla con la misma maceta para limitar su crecimiento y que no se extienda mucho, ya que es muy invasora y competiría con las otras especies que estén a su alrededor. (Ministerio de Salud de Chile, 2019)

Tabla 3. Características importantes del cultivo de menta.

Nombre Común	Menta.
Familia	Lamiaceae.
Descripción	Es una planta de tipo herbácea, de color verde, muy ramificado con tallos erguidos y pubescentes, presenta hojas opuestas ovaladas, un tanto aserradas y pubescentes muy aromáticas. Las flores de color lila-azulado se agrupan en espigas terminales.
Distribución	Su origen se remonta en regiones asiáticas como la antigua Mesopotamia. Se cultiva grandes cantidades en Alemania, en los alrededores de Turingia; así como en Francia, Inglaterra, Rusia, India y Japón
Parte Utilizada	Hojas.
Usos Tradicionales	La planta se emplea como carminativo y antiflatulento, para aliviar los dolores de estómago, náuseas, fiebre y dolores de cabeza. Las Hojas y las flores se utilizan como antiespasmódicos, diaforéticos y estomáquicos. También se emplea para aliviar la congestión nasal, calmar palpitaciones cardiacas, diarreas y expulsar cálculos biliares. Es una planta típica en la comida inglesa, en la que se usa fresca o seca, ya que no pierde su aroma, además de usarse para el té; es un excelente aderezo que congenia con casi todas las comidas y aderezos. Su aroma se extrae para aromatizar licores, chocolates y caramelos. Su uso en exceso puede causar intoxicaciones.

Fuente: (D. Castro et al., 2013)

Elaboración: Autor

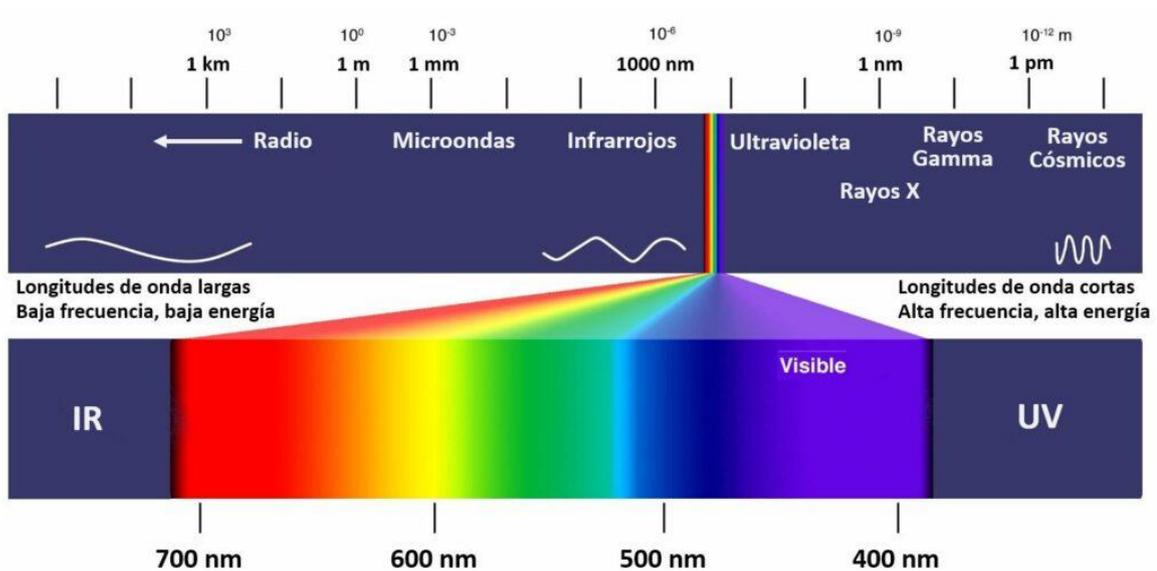
8.4 Espectro electromagnético

Radiación electromagnética se le denomina al flujo saliente de energía de una fuente a manera de ondas electromagnéticas. Esta radiación puede darse de origen natural o artificial. El espectro electromagnético corresponde al conjunto de todas las frecuencias (número de ciclos de la onda por unidad de tiempo) posibles a las que se produce radiación electromagnética. (Luque, 2012)

El espectro electromagnético se constituye por un conjunto de ondas de distintas características, las cuales se clasifican de acuerdo con su longitud, frecuencia y energía. Es importante anotar que las ondas con mayor longitud tienen menor frecuencia y viceversa.

El estudio de los espectros de líneas de diferentes elementos químicos generó el desarrollo de nuevas teorías que fueran capaces de interpretar los resultados experimentales. (Salcedo, 2012)

Imagen 3. Espectro Electromagnético



Fuente: (Salcedo, 2012)

El espectro de la luz no está solo hecho por los colores que observamos con nuestros ojos. Existen otros colores que son invisibles, aunque pueden ser detectados con los dispositivos apropiados. Más allá del ultravioleta tenemos el ultravioleta, rayos-X y rayos gamma. En el otro extremo, pasando el rojo, se encuentra presente el infrarrojo y el radio. Aunque no podemos verlos, estamos acostumbrados a este tipo de ondas: por ejemplo, empleamos ondas de radio para transmitir música de una estación hasta el receptor de nuestro coche, la luz ultravioleta del sol hace que nos pongamos morenos en verano, los Rayos-X se utilizan para hacer radiografías y ver si hay algún hueso roto o cambiamos el canal de nuestra tele usando el mando a distancia. (Booklet, 2018)

Tabla 4. El espectro electromagnético abarca las siguientes regiones: ondas de baja y radiofrecuencia, microondas, infrarrojo, visible, ultravioleta, rayos X y rayos Gamma.

Luz visible	Newton fue el primero en descomponer la luz visible blanca del Sol en sus componentes mediante la utilización de un prisma. La luz blanca está constituida por la combinación de ondas que tienen energías semejantes sin que alguna predomine sobre las otras. Las frecuencias más bajas de la luz visible (longitud de onda larga) se perciben como rojas y las de más alta frecuencia (longitud corta) aparecen violetas.
Rayos infrarrojos	La radiación infrarroja se localiza en el espectro entre 3×10^{11} hz, hasta aproximadamente los 4×10^{14} Hz. La banda infrarroja se divide en tres secciones de acuerdo a su distancia a la zona visible: próxima (780 - 2500 nm), intermedia (2500 - 50000 nm) y lejana (50000 - 1mm). Toda molécula que disponga una temperatura superior al cero absoluto (-273° K) emite rayos infrarrojos y su cantidad está directamente relacionada con la temperatura del objeto.
Microondas	La región de las microondas se encuentra entre los 10^9 hasta aproximadamente 3×10^{11} Hz (con longitud de onda entre 30 cm a 1 mm).
Ondas de radio	La región de ondas de radio se extiende desde algunos Hertz hasta 10^9 hz con longitudes de onda desde muchos kilómetros hasta menos de 30 cm.
Rayos X	En 1895 Wilhelm Röntgen inventó una máquina que producía radiación electromagnética con una longitud de onda menor a 10 nm a los cuales debido a que no conocía su naturaleza las bautizó como X.
Radiación ultravioleta	Sus longitudes de onda se extienden entre 10 y 400 nm más cortas que las de la luz visible.
Rayos gamma	Se localizan en la parte del espectro que tiene las longitudes de onda más pequeñas entre 10 y 0.01 nm.

Fuente: (S. Garcia, 2004)

Elaboración: Autor

8.5 RAMAN

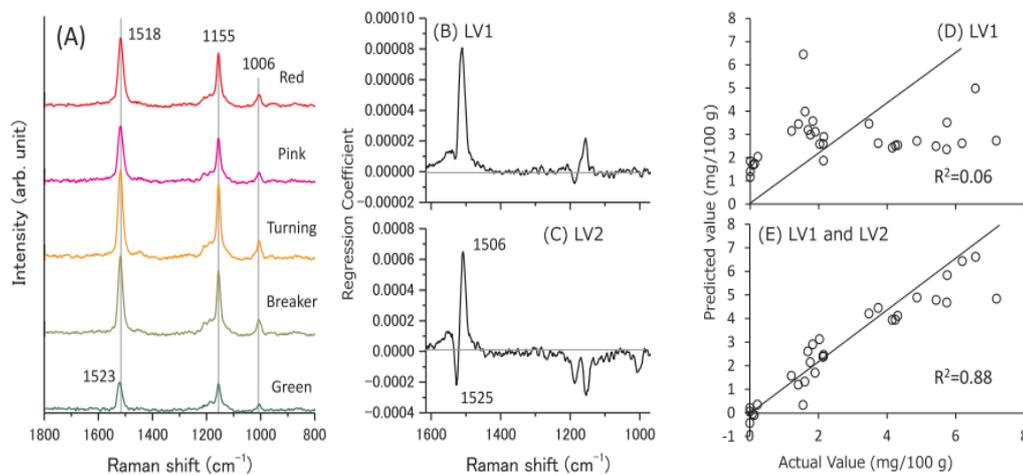
El Raman corresponde a una técnica rápida que permite el análisis de muestras sólidas, líquidas y gaseosas. También en la mayoría de los casos es una técnica no invasiva ni destructiva. Se utiliza en la mayoría de campos, desde la alimentación, medicina y análisis de objetos

históricos, entre otros. Se han implementado nuevos diseños basándose en las propiedades físicas de las radiaciones para analizar las muestras de diferente manera y se han desarrollado nuevas técnicas para generar la radiación o analizar los datos. (Álvarez, 2021)

Técnica de espectroscopía RAMAN

Cuando un haz de luz actúa sobre un conjunto de moléculas una cantidad pequeña de esta radiación (~ 1 en 10^7 fotones) es esparcida inelásticamente a frecuencias ópticas mayores o menores que la frecuencia de los fotones incidentes. El proceso que genera este esparcimiento inelástico es conocido como efecto Raman. La diferencia de la energía entre el fotón incidente y el fotón Raman esparcido es igual a la energía de una vibración de la molécula. Una gráfica de la intensidad de la luz esparcida versus la diferencia de energía, corresponde a un espectro Raman. (Acosta et al., 2016)

Imagen 4 Longitud de onda de excitación de carotenoides en tomates mediante espectroscopía RAMAN



Fuente: (Hara et al., 2018)

La espectroscopía RAMAN es una herramienta sumamente utilizada en el estudio de una gran variedad de materiales, debido a que es una técnica rápida, no es destructiva y que no necesita preparación de la muestra. En la rama de la fitotecnia, la espectroscopía Raman se ha utilizado para el estudio de plantas, frutas y vegetales. (Zamora et al., 2018)

8.6 Espectroscopía Óptica

La espectroscopia óptica abarca todos aquellos métodos analíticos que forma parte de la interacción de la luz y la materia y durante más de doscientos años se ha utilizado en múltiples campos debido a su gran especificidad. La medida de parámetros ópticos en función de la longitud de onda (espectro) se transforma en la huella dactilar de la materia bajo análisis (firma espectral), de forma que ésta es distinguible de forma inequívoca de todas las demás a partir de sus propiedades espectrales. (B. Garcia & Portilla, 2012)

Las mediciones que genera la espectroscopía óptica son técnicas experimentales sólidas, que dan información de manera indirecta de las propiedades microscópicas de los materiales o dispositivos, a partir de relaciones conceptuales entre la estructura de la materia y su interacción con la luz. En general existen variedad de tipos de mediciones espectroscópicas. (Salcedo, 2012)

Ventaja de la espectroscopía óptica

Una de las ventajas más importantes que brindan la mayoría de estas técnicas corresponde a ser no destructivas, pues no necesitan una preparación previa de la muestra y sólo unas pocas exigen la deposición de contactos por ejemplo: fotovoltaje, fotocorriente y fotoconductividad. También ayuda para el análisis de muestras pequeñas, lo cual permite dividir la estructura obtenida en varias partes para ser caracterizada por diferentes técnicas. (Homs et al., 2004)

9. VALIDACIÓN DE LAS PREGUNTAS CIENTÍFICAS O HIPÓTESIS

¿Cómo se detecta bioactivos mediante espectroscopía óptica?

La espectroscopia óptica permite caracterizar materiales en función de sus interacciones con diferentes fuentes de luz. Esta luz en diferentes rangos de energía es absorbida por los diferentes compuestos moleculares que poseen los materiales bioactivos. Esta absorción

produce picos en los espectros dependiendo del tamaño y estructura composicional. De esta manera los picos encontrados en los espectros corresponderán a las vibraciones moleculares de estos compuestos, verificando de esta manera su presencia.

10. METODOLOGÍA

Tabla 5. PROCEDIMIENTO 1 – MUESTRA SIMPLE

Menta Piperita (<i>Mentha piperita</i>)	
<p>Toma de muestras sólidas directamente de la planta. Muestras enteras. Se usa una tijera común para obtener raíces, tallo, hojas, flores y frutos.</p> <p>Lavado de muestras con agua potable.</p>	
<p>Desinfección de instrumentos con alcohol y las muestras con agua destilada.</p>	

Ubicación de las muestras sobre papel aluminio para organizar los instrumentos y cortes.



Rotulado de las placas: raíz, tallo, hojas, flores y frutos, 5 tomas por portaobjetos.



Corte de Muestras

Raíz: Doble corte longitudinal de la raíz.



Tallo: No se retira la capa superficial.
Se usan los estomas, los tallos más delgados.
Corte transversal.



Hojas: No se retira la capa superficial.
Corte cuadrado de 5 partes de la hoja. No se toma en cuenta el medio central.



Melatonina 3 Mg pastillas

Tableta: Se corta la tableta por la mitad.
Se toma la muestra del centro de la tableta evitando el revestimiento de la pastilla.



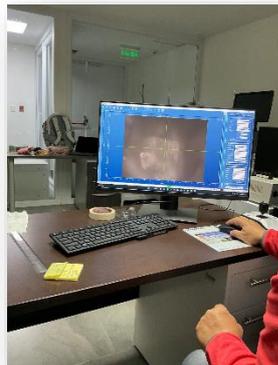
Uso de cinta doble faz en el portaobjetos para ubicar las muestras planas.



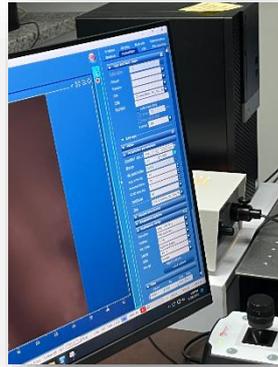
Ubicación de 5 muestras por cada portaobjetos.



Se ubica cada porta objetos + muestras en RAMAN.



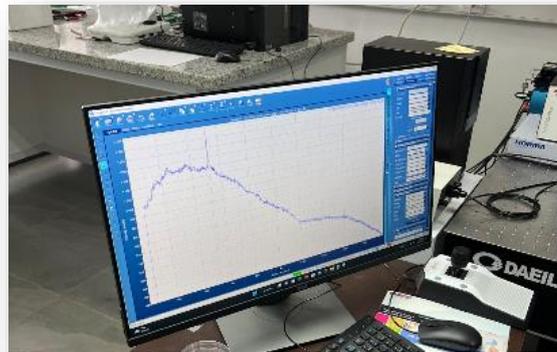
Uso de RAMAN en 785 nm, 633 nm y 785 nm al 50%.



Se toman tres puntos por cada muestra para que sea válido el resultado.



Análisis de espectros.



Fuente: Autor

Tabla 6. PROCEDIMIENTO 2 – MUESTRA + NANOPARTÍCULAS AuQ
EXTRACCIÓN + SARS (PARTÍCULAS DE ORO)

Tomillo (<i>Thymus vulgaris L.</i>)	
<p>Toma de muestras sólidas directamente de la planta. Muestras enteras.</p> <p>Hojas: Se toman las hojas de cada rama. Se trabaja con 7,48 g de tomillo puro ya lavado con agua destilada.</p>	
<p>Lavado de muestras con agua potable.</p> <p>Desinfección de las muestras con agua destilada.</p>	
<p>Se añade metanol al 99% hasta cubrir la muestra.</p>	

Se cierra la muestra (frasco) con papel parafinado.



Ubicación de las muestras en baño de ultrasonido:

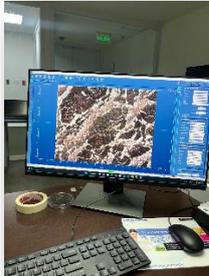
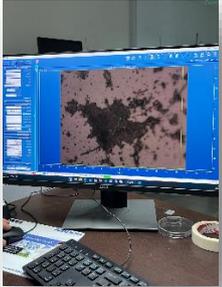
Al Tiempo	Temperatura
25 min	31°
+ 3 min	31°
+ 7 min	33°
Total: 35 min	34°



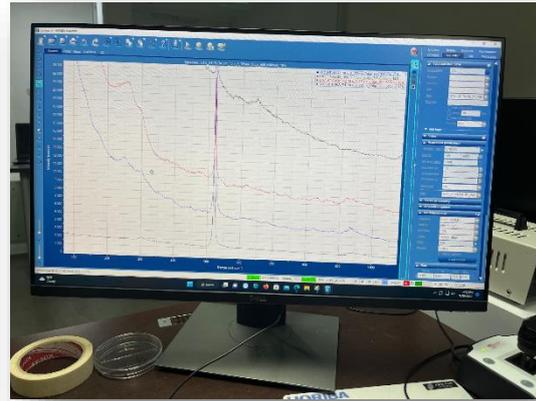
Posterior al baño de ultrasonido, se ubican las muestras en la microcentrifugadora. Dos muestras propias, dos frascos para balancear:

RPM	Tiempo	Cantidad	Número
10 000	15 min	2ml	2 frascos
10 000	25 min	2ml	2 frascos
10 000	30 min	1 ml	2 frascos*



<p>Se obtiene 0,5 ml de concentrado de tomillo (*0,25 ml + 0,25 ml de cada frasco), se aumenta 0,5 ml Au nanopartículas. Total de muestra: 1ml</p>	
<p>Cortes de wafer de silicio (3).</p>	 
<p>Portaobjetos + cinta doble faz + wafer de silicio.</p> <p>En los portaobjetos se ubican: 2 muestras HT + Au nano, 1 muestra pura de HT sin centrifugar (HT – hojas de tomillo).</p>	 
<p>Observación de las muestras en RAMAN.</p>	 

Análisis de espectros.



Fuente: Autor

Tabla 7. PROCEDIMIENTO 3 – TIP SONICATOR

Tomillo (<i>Thymus vulgaris L.</i>) Menta Piperita (<i>Mentha piperita</i>)	
<p>Se elije al azar 3 plantas de menta piperita y 3 plantas tomillo de las 10 plantas que se acondicionó de cada especie en el vivero.</p>	

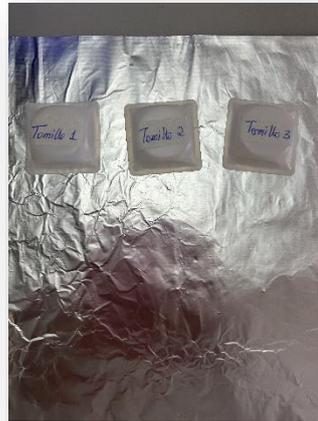
Toma de muestras sólidas directamente de la planta. Muestras enteras. Se toman solo las hojas de las plantas.

Lavado de muestras con agua potable.

Desinfección de instrumentos con alcohol y las muestras con agua destilada (5 lavadas por muestra).



Ubicación de las muestras sobre papel aluminio para organizar los instrumentos y las muestras.



Mediante balanza se toma 0,3 gramo de cada muestra, total 3 muestras de menta piperita y 3 muestras de tomillo.

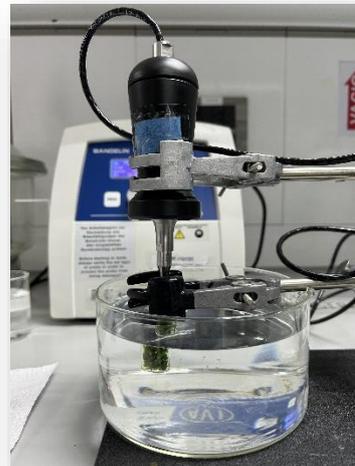


En frascos de borosilicato se ubica 0,3 g de tomillo + 4 ml de metanol (hasta cubrir la muestra). Se repite el procedimiento para las tres muestras de tomillo y menta piperita.



Se ubican los frascos con las muestras en el Tip sonicator, ubicando su punta de 0,5 mm a 1 cm dentro de la muestra.

Se hacen repeticiones de 15 seg de pulso y 5 seg de descanso. Total 50 min de disruptor celular.

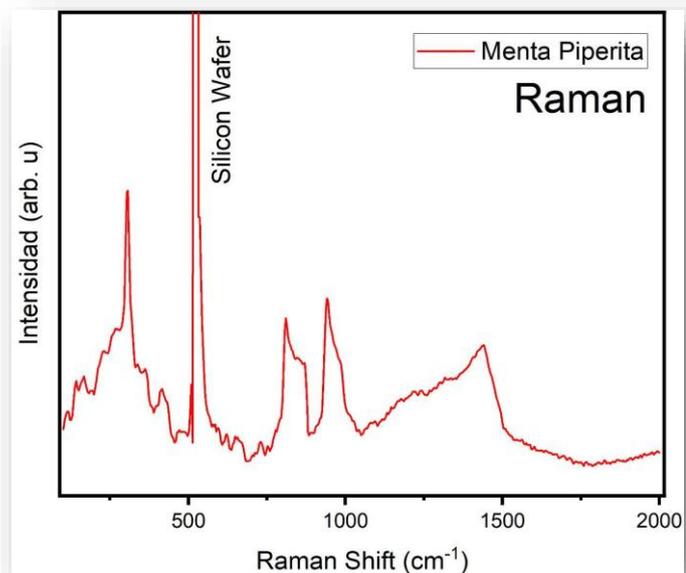
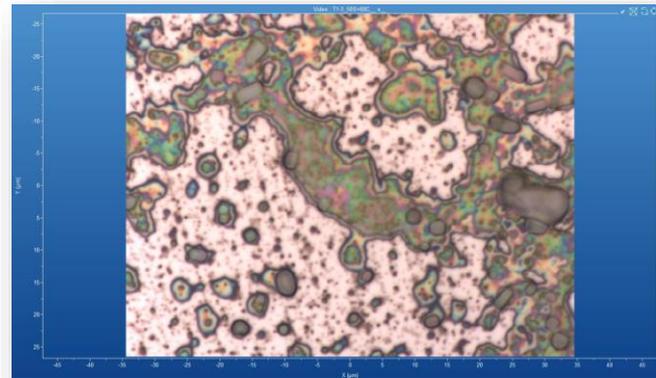


Una vez terminado el proceso de disrupción celular, se procede a centrifugar las muestras.



Observación de las muestras en RAMAN.

Análisis de espectros.



10.1 Definición del problema

La formulación del problema se dio mediante la pregunta ¿Cómo se detecta bioactivos mediante espectrometría óptica? Además, de dos preguntas directrices: ¿Qué tipo de reactivos y métodos son efectivos para extraer bioactivos de las plantas mediante disrupción celular? y ¿Qué métodos se han usado para identificar el espectros de bioactivos en plantas?

La espectroscopía óptica permite caracterizar materiales en función de sus interacciones con diferentes fuentes de luz.

Esta luz en diferentes rangos de energía es absorbida por los diferentes compuestos moleculares que poseen los materiales bioactivos.

Esta absorción produce picos en los espectros dependiendo del tamaño y estructura composicional. De esta manera los picos encontrados en los espectros corresponderán a las vibraciones moleculares de estos compuestos, verificando de esta manera su presencia.

10.2 Planificación.

La organización y prácticas de laboratorio del proyecto se llevaron a cabo durante el período noviembre 2022– enero 2023 en los que se realizó reuniones semanales los días lunes y miércoles, mediante las primeras reuniones de trabajo se definió el tema, cronograma de actividades a realizarse y prácticas de laboratorio.

10.3 Desarrollo.

10.3.1 Búsqueda de métodos de extracción de bioactivos de plantas

Se realizó la búsqueda de información en las diferentes bases de datos científicas.

10.3.2 Visitas de campo

Se realizan visitas de campo a la Universidad Yachay Tech a los laboratorios de La Escuela de Ciencias Físicas y Nanotecnología para el uso de laboratorios de Física.

10.3.3 Laboratorio

Se utilizó los distintos equipos del laboratorio de Física de la Universidad Yachay Tech de La Escuela de Ciencias Físicas y Nanotecnología. Los cuales se mencionan a continuación:

Tabla 8. Equipos del laboratorio de Física de la Universidad Yachay Tech de La Escuela de Ciencias Físicas y Nanotecnología.

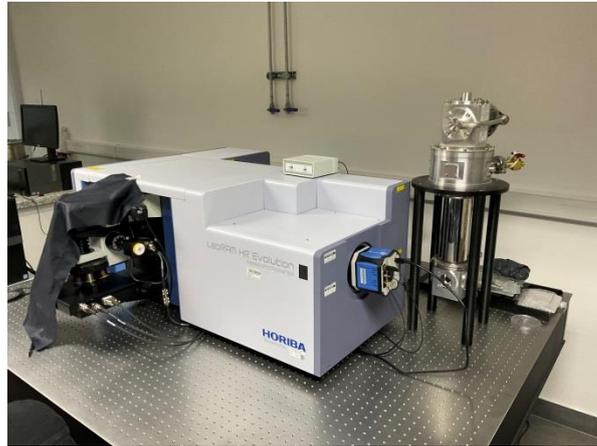
UV-Vis: Genova
Nano Jenway
spectrophotometer.

Se trabajo con
longitudes de onda
de 200 nm a 1000
nm.



RAMAN Horiba:
Longitudes de
ondas de 633 nm y
785 nm al 50%

Área de
irradiacion
(5 μm)

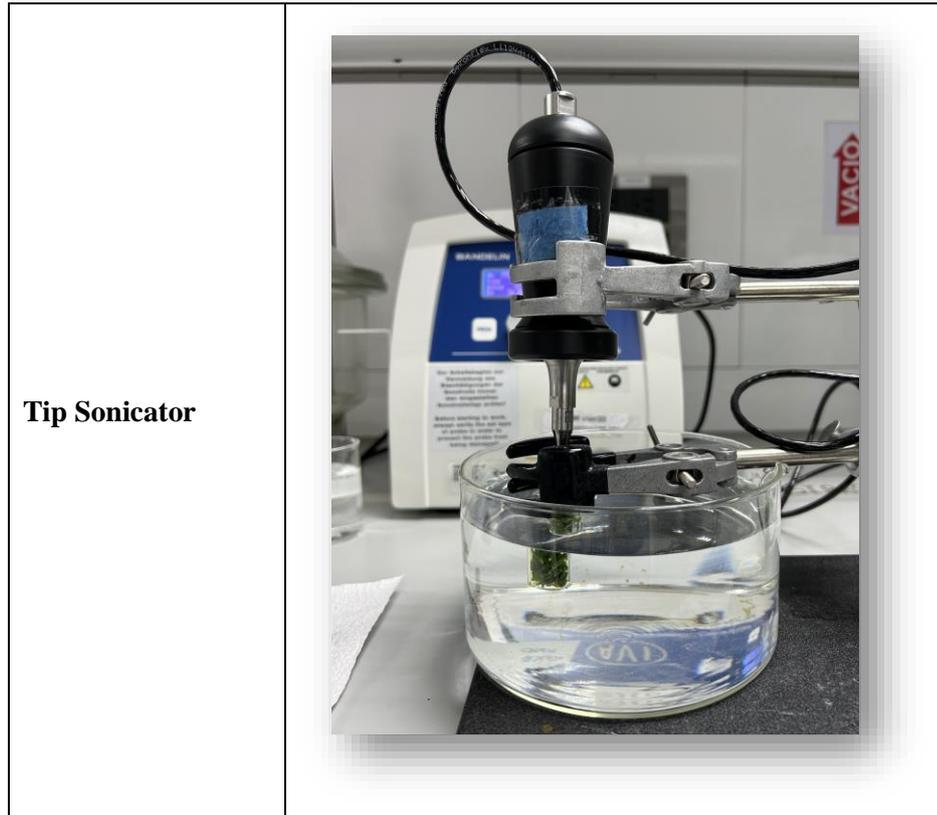


Centrifugadora de Laboratorio
Gusto: Se trabajo con 10000 rpm en distintos tiempos.



Bath Sonicator





10.3.4 Invernadero

Urcuquí se caracteriza por presentar sus máximos lluviosos en los meses de abril y noviembre.

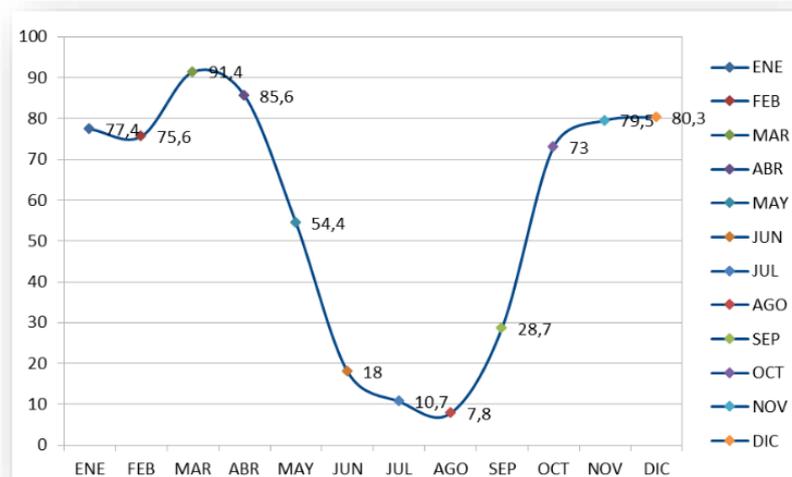


Gráfico 1. Precipitaciones para el cantón Urcuquí
Fuente: (GAD MUNICIPAL URQUQUÍ, 2014)

La cabecera parroquial posee como coordenadas geográficas de latitud norte 0° 25' 13" y longitud oeste 78° 11' 50", tiene una temperatura promedio que oscila entre los 14°C a 19°C, se encuentra a una altura de 2,307 msnm, según los datos geo referenciados (GAD MUNICIPAL URCUQUÍ, 2014).

Tabla 9. Trabajo en campo realizado con las dos especies vegetales (*Thymus vulgaris L.*, *Mentha piperita*):

12/01/2023

- Limpieza del lugar destinado para las dos especies.
- Implementación de las macetas de tomillo y menta piperita (10 plantas por especie) en las camas realizadas, con una distancia de 30 cm por planta.



20/01/2023

- Incorporación de un bioestimulante (POWER FOL)
- Control de plagas y enfermedades.
- Riego.



27/01/2023

- Control de plagas y enfermedades.
- Riego.



<p>31/01/2023</p> <ul style="list-style-type: none"> • Control de plagas y enfermedades. • Riego. 	
<p>03/02/2023</p> <ul style="list-style-type: none"> • Incorporación de un extracto de algas (Agrostemin) 1 gramo/litro de agua a las dos especies vegetales tomillo y menta piperita. • Control de plagas y enfermedades. • Riego. 	
<p>09/02/2023</p> <ul style="list-style-type: none"> • Incorporación de un extracto de algas (Agrostemin) 1 gramo/litro de agua a las dos especies vegetales tomillo y menta piperita. • Control de plagas y enfermedades. • Riego. 	

13/02/2023

- Toma de muestras (hojas) de las dos especies vegetales tomillo y menta piperita.



Fuente: Autor

10.4 Proceso de extracción mediante homogenización y disrupción celular

Para conocer la estructura o función de un orgánulo celular determinado, lo primero que se debe realizar es purificarlo, es decir, separarlo del resto de los orgánulos celulares. Para eso es necesario romper la membrana plasmática. Este proceso se lo define como homogeneización y la disolución resultante es un homogenado celular o extracto crudo. A partir del extracto crudo, al ser combinando con diversas técnicas de separación como la centrifugación y la cromatografía, se puede purificar el orgánulo o la macromolécula deseada.

Existen diversos métodos para romper la membrana plasmática y su eficacia relativa depende del tipo de la célula que se está investigando. Los métodos físicos más utilizados son el choque osmótico, los ultrasonidos y la trituración mecánica. Estos procedimientos ayudan a romper la mayoría de las membranas celulares (membrana plasmática y membranas del retículo endoplasmático) en fragmentos que se cierran inmediatamente sobre sí mismos generando pequeñas vesículas cerradas denominadas microsomas. El proceso de homogenización se debe realizar a baja temperatura (4°C), utilizando medios tamponados que mantengan constante el

pH intracelular. De este modo, los orgánulos celulares (núcleo, mitocondria, aparato de Golgi, lisosomas, peroxisomas, etc.) permanecen intactos y mantienen la mayoría de sus propiedades bioquímicas originales.(Arguello, 2022)

10.5 Finalización

Prueba de medición de espectros en UV-VIS y RAMAN.

11. ANALISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

OBJETIVO	RESULTADOS
<p>Acondicionar las especies vegetales tomillo y menta piperita (<i>Thymus vulgaris</i> L., <i>Mentha piperita</i>) bajo condiciones de campo Urcuqui, Imbabura.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Especies de 7 semanas. - Hojas de cada especie sin presencia de plagas y enfermedades. - Las especies de menta y tomillo lograron adaptarse a las condiciones medioambientales de Yachay Tech, sector Urcuquí. <p><i>''Our data agree with those of some authors; for example, the observation of high melatonin levels in plants from Alpine and Mediterranean environments (Conti et al., 2002); the higher melatonin level of water hyacinth plants grown under natural conditions (sunlight) compared with those of plants cultured in artificial light''</i>. Growth conditions influence the melatonin content of tomato plants. Marino Bañón Arnao ↑, Josefa Hernández-Ruiz. Food Chemistry 138 (2013) 1212–1214.</p> <p><i>''In the current study, the effects of melatonin on the apple tree flowering have been systematically investigated. For consecutive 2-year monitoring, it was found that the flowering was always associated with the drop of melatonin level in apple tree''</i>. Haixia Zhang, Apple tree flowering is mediated by low level of melatonin under the regulation of seasonal light signal. Journal of Pineal research. DOI: 10.1111/jpi.12551.</p>
<p>Identificar y seleccionar muestras de material vegetal para análisis de bioactivos de plantas con espectrometría RAMAN.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Se logró obtener muestras y cantidad de hojas de menta y tomillo en óptimas condiciones para el proceso de extracción.

	<ul style="list-style-type: none"> - Procedimiento 1 (Primeras mediciones de espectros de bioactivos en RAMAN en 785 nm y 633 nm).
<p>Probar métodos de extracción de bioactivos de las dos especies vegetales tomillo y menta piperita (<i>Thymus vulgaris</i> L., <i>Mentha piperita</i>) mediante la técnica de disrupción celular, para su evaluación por espectrometría óptica UV-VIS y RAMAN.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Procedimiento 2 y 3 de extracción de bioactivos de las dos especies vegetales. - Uso de Methanol. - Disrupción celular. - Centrifugación. <p><i>“According to Byeon and Back (2014), melatonin concentrations in tomato fruit were extracted and determined with some modifications. In short, tomato fruit (200 mg) was ground into powder with appropriate amount of liquid N2, and the extracted solutions were transferred into centrifuge tubes and stored overnight at the temperature of 4 ° C after adding 1 mL of methanol. After 10 min centrifugation at 10,000 × g, the supernatants were transferred into new tubes”.</i></p> <p>Li Yana, Liu Change, Shi Qinghuaa, Yang Fengjuana, Wei Mina. Mixed red and blue light promotes ripening and improves quality of tomato fruit by influencing melatonin content. 2021.</p>

Fuente: Autor

12. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

OBJETIVO	CONCLUSIONES
Acondicionar las especies vegetales tomillo y menta piperita (<i>Thymus vulgaris L.</i> , <i>Mentha piperita</i>) bajo condiciones de campo Urcuqui, Imbabura.	<ul style="list-style-type: none"> - Tener especies en óptimas condiciones para la extracción de bioactivos, para que la muestra no se oxide.
Identificar y seleccionar muestras de material vegetal para análisis de bioactivos de plantas con espectrometría RAMAN.	<ul style="list-style-type: none"> - Se trabaja en muestras de diferentes partes de la planta: raíz, tallo y hojas, de las cuales se presentó mayor concentración de bioactivos en las hojas.
Probar métodos de extracción de bioactivos de las dos especies vegetales tomillo y menta piperita (<i>Thymus vulgaris L.</i> , <i>Mentha piperita</i>) mediante la técnica de disrupción celular, para su evaluación por espectrometría óptica UV-VIS y RAMAN.	<ul style="list-style-type: none"> - Se logró obtener concentraciones de bioactivos, siendo el procedimiento 3 el más óptimo con condiciones: disruptor celular por 5 min en tip sonicator. - Disrupción celular a los 50 minutos rompe las células y se elimina tejido celular. - El uso de las nanopartículas de oro destruyó la muestra no permitiendo un área de material óptima para bombardear con laser la muestra, por lo tanto el procedimiento 2 queda descartado.

OBJETIVO	RECOMENDACIONES
Acondicionar las especies vegetales tomillo y menta piperita (<i>Thymus vulgaris L.</i> , <i>Mentha piperita</i>) bajo condiciones de campo Urcuqui, Imbabura.	<ul style="list-style-type: none"> - Trabajar con especies de 12 - 15 semanas para verificar aumento o disminución de bioactivos en las muestras.
Identificar y seleccionar muestras de material vegetal para análisis de bioactivos de plantas con espectrometría RAMAN.	<ul style="list-style-type: none"> - Trabajar con hojas pequeñas en el caso de la menta piperita.
Probar métodos de extracción de bioactivos de las dos especies vegetales tomillo y menta piperita (<i>Thymus</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Disrupción celular cada 15 seg hasta los 5 min para verificar el comportamiento de las células. - Centrifugación de las muestras por más de una hora. - Repetición de procedimientos antes realizados.

<i>vulgaris L., Mentha piperita</i>) mediante la técnica de disrupción celular, para su evaluación por espectrometría óptica UV-VIS y RAMAN.

13. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, C., Vázquez, P., Moreno, S., Avila, R., Vertiz, A., & Rangel, A. (2016). *ANÁLISIS DE MEDICAMENTOS MEDIANTE ESPECTROSCOPIA RAMAN*. 1–7. <https://www.ptonline.com/articles/how-to-get-better-mfi-results>
- Álvarez, J. (2021). *Estudio y modelización del proceso de germinación de semillas de triticale sometidas a tratamiento magnético*. 1, 205. https://oa.upm.es/66821/1/REGINO_JOSE_ALVAREZ_SANCHEZ.pdf
- Arguello, M. (2022). *Práctica 1: Métodos De Ruptura Celular Fundamento Teórico*.
- Back, K. (2021). Melatonin metabolism, signaling and possible roles in plants. *Plant Journal*, 105(2), 376–391. <https://doi.org/10.1111/tpj.14915>
- Booklet, C. (2018). *El espectro electromagnético*.
- Carbajal, Á. (2013). Componentes bioactivos. *Manual de Nutrición y Dietética*, 102–106. <https://www.ucm.es/nutricioncarbajal/>
- Castro, D., Diaz, J., & Serna, R. (2013). *Cultivo y producción de plantas aromáticas y medicinales*.
- Castro, P. (2015). *Análisis de crecimiento y acumulación de biomasa en tomillo (Thymus vulgaris L.)*.
- Chen, G., Huo, Y., Tan, D. X., Liang, Z., Zhang, W., & Zhang, Y. (2003). Melatonin in Chinese medicinal herbs. *Life Sciences*, 73(1), 19–26. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(03\)00252-2](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(03)00252-2)
- De La Torre, A. (2016). Melatonina Y Ligandos. Las Plantas Medicinales Como Fuente De Melatonina. *Universidad Complutense*, 1–3. https://eprints.ucm.es/id/eprint/50951/1/ALMUDENA_DE_LA_TORRE_MORENO.pdf
- GAD MUNICIPAL URCUQUÍ. (2014). *Plan De Desarrollo Y Ordenamiento Territorial San*

Miguel De Urcuquí (2014-2025). 426.

- García, B., & Portilla, O. (2012). Espectroscopia óptica de imagen para el control de calidad en la industria alimentaria, monitorización en línea de procesos de soldadura y discriminación de patologías tumorales en tejidos cancerígenos. *Optica Pura y Aplicada*, 45(3), 345–360. <https://doi.org/10.7149/OPA.45.3.345>
- García, S. (2004). La luz y el espectro electromagnético. *Instrumentos de Información Electromagnetismo*, 1–13. https://webs.um.es/gregomc/IntroduccionAstronomia/Temas/04_INSTRUMENTOS_DE_OBSERVACION.pdf
- Gimeno, J. (2001). Tomillo (*Thymus vulgaris* L.). *Medicina Naturista*, 3, 53–55.
- González, A. (2020). *Melatonina Y Su Importancia En Plantas*.
- Hara, R., Ishigaki, M., Kitahama, Y., Ozaki, Y., & Genkawa, T. (2018). Excitation wavelength selection for quantitative analysis of carotenoids in tomatoes using Raman spectroscopy. *Food Chemistry*, 258(February), 308–313. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.089>
- Homs, R., Fontanella, J., Purón, E., & Díaz, R. (2004). *Desarrollo de un sistema automatizado para mediciones de espectroscopía óptica*. <https://rielac.cujae.edu.cu/index.php/riecac/article/view/64>.
- Illnait-Ferrer, J. (2012). Melatonin: the actuality of a forgotten hormone. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 43(3). <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181226874007>
- Luque, J. (2012). Espectro electromagnético y espectro radioeléctrico. *Acta*, Núm. 62, 19–23. <https://www.acta.es/recursos/revista-digital-manuales-formativos/13-062>
- Martínez, N., Camacho, V., & Martínez, J. (2008). Los compuestos bioactivos de las frutas y sus efectos en la salud. *Actividad Dietética*, 12(2), 64–68. [https://doi.org/10.1016/S1138-0322\(08\)75623-2](https://doi.org/10.1016/S1138-0322(08)75623-2)
- Ministerio de Salud de Chile. (2019). Menta / Menta negra. *Medicamentos Herbarios Tradicionales*, 115–116. <https://www.minsal.cl/portal/url/item/7d99ff5a580ddb7e04001011f016dc3.pdf>
- Poza, J. J., Pujol, M., Ortega-Albás, J. J., & Romero, O. (2022). Melatonin in sleep disorders.

Neurologia, 37(7), 575–585. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2018.08.002>

- Quispe, D. (2016). USO TERAPEUTICO DE Menta piperita (MENTA) EN POBLADORES DEL ASENTAMIENTO HUMANO LAS LOMAS DE LA PRADERA. PIMENTEL. CHICLAYO, SETIEMBRE 2014 – SETIEMBRE 2015. In *Tesis*. http://repositorio.uladech.edu.pe/bitstream/handle/123456789/206/VARGAS_CABANILLAS_LISSETH_ROXANA_USO_ANTIINFLAMATORIOS_NO_ESTEROIDEOS.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Rodríguez, Z., Robaina, Ma., Jáuregui, U., Blanco, A., & Rodríguez, J. (2014). Empleo de la radiación ultrasónica para la extracción de compuestos bioactivos provenientes de fuentes naturales. Estado actual y perspectivas | Revista CENIC Ciencias Químicas. *Cenic*, 45(1). <https://revista.cnic.cu/index.php/RevQuim/article/view/375>
- Salcedo, M. (2012). Revista Big Bang Fautiniano Vicerrectorado de Investigación. *Revista Big Bang Fautiniano*, 1, 36–38. <https://revistas.unjfsc.edu.pe/index.php/BIGBANG/article/view/384>
- Sánchez, L. E., Dinah García, L., Carballo, T. C., & Crespo, T. M. (1996). ESTUDIO FARMACOGNOSTICO DE Mentha x piperita L. (TORONJIL DE MENTA). *Rev Cubana Plant Med*, 1(3), 40–45.
- Zamora, L., Rodríguez, R., García, L., Hernnández, J., & Hernandez, T. (2018). ESTUDIO DEL PERICARPIO DE CHILE HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.) POR ESPECTROSCOPIA RAMAN. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, 3(ahead), 0–0. <https://doi.org/10.4067/s0719-38902018005000103>

14. ANEXOS

Sin anexos.