

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA LA
EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE ROMERO PARA SU USO COMO
ANTIOXIDANTE EN ACEITES COMERCIALES.**

PROYECTO DE GRADUACIÓN SOMETIDO A CONSIDERACIÓN DE LA ESCUELA
DE INGENIERÍA QUÍMICA COMO REQUISITO PARA OPTAR POR EL GRADO DE
LICENCIATURA EN INGENIERÍA QUÍMICA

PEDRO ALBERTO VENEGAS VALVERDE

CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO

SAN JOSÉ, COSTA RICA

2016

Informe de proyecto de graduación sometido a la consideración de la Escuela de Ingeniería Química como requisito final para optar al grado de Licenciatura en Ingeniería Química

Sustentante:

Pedro Alberto Venegas Valverde

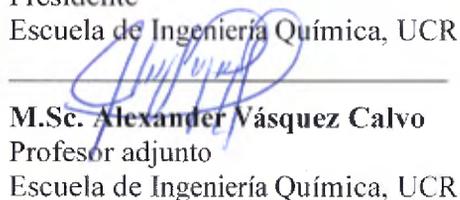
Aprobado por:

Presidente del tribunal



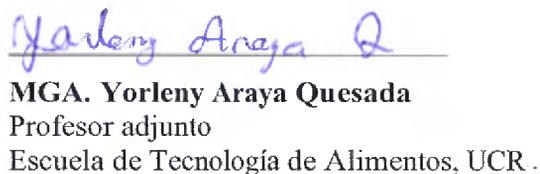
M.Sc. Rodolfo Wattson Gómez
Presidente
Escuela de Ingeniería Química, UCR

Director del proyecto



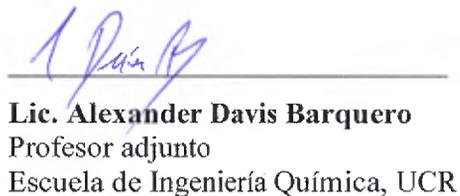
M.Sc. Alexander Vásquez Calvo
Profesor adjunto
Escuela de Ingeniería Química, UCR

Lector del proyecto



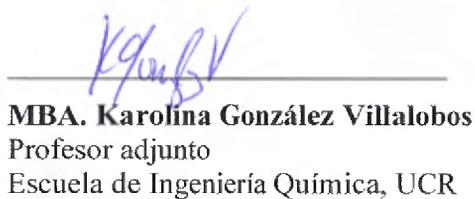
MGA. Yorlenny Araya Quesada
Profesor adjunto
Escuela de Tecnología de Alimentos, UCR .

Lector del proyecto



Lic. Alexander Davis Barquero
Profesor adjunto
Escuela de Ingeniería Química, UCR

Miembro invitado



MBA. Karolina González Villalobos
Profesor adjunto
Escuela de Ingeniería Química, UCR

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
2016

*“No sé la clave del éxito pero la clave del fracaso es
intentar agradar a todo el mundo”*

Bill Cosby

DEDICATORIA

Dedico este logro a mi familia, que han estado conmigo en todo momento y me han apoyado siempre en todas mis decisiones, son una familia maravillosa.

AGRADECIMIENTO

Primero deseo agradecer a mis padres por todo el apoyo y la paciencia que me han dado siempre en todas mis decisiones.

A mis compañeros y amigos, por todos los momentos compartidos en estos años tanto felices como tristes.

A mis profesores de carrera, por haberme dado los conocimientos para convertirme en un profesional.

A Yorleny Araya Quesada por sus valiosos aportes al proyecto y por su disposición y ayuda.

Al personal de los laboratorios de la escuela de Ingeniería Química, la escuela de Tecnología de alimentos, el CITA y el CIPRONA por su cooperación y ayuda a lo largo del proceso.

RESUMEN

El objetivo de este proyecto fue evaluar las mejores condiciones experimentales para la extracción de aceite esencial de romero para utilizar como antioxidante en aceites comerciales. Para esto, se determinaron las condiciones de operación necesarias para llevar a cabo el proceso y se analizaron las características de los productos obtenidos.

El proyecto nace a solicitud de una docente de la escuela de Tecnología de Alimentos con el fin de evaluar condiciones y métodos de extracción de aceites esenciales para su uso como ingrediente funcional en múltiples productos alimenticios y farmacéuticos y que este cumpla con características de grado alimentario.

Para cumplir con el objetivo general se realizó un estudio teórico, el cual abarca los diferentes tipos de extracción y las variables que afectan a este. Además, se realizó una investigación acerca de las aplicaciones que presentan los aceites esenciales en diferentes ramas de la ciencia.

Luego, con la investigación de los puntos anteriores se realizaron las pruebas antioxidantes en aceites vegetales para determinar la aplicabilidad del aceite esencial obtenido como antioxidante. También, se realizó una cromatografía de gases al producto obtenido para caracterizar sus componentes y determinar cuáles han mostrado capacidad antioxidante en estudios anteriores.

En la primera etapa experimental se realizó el rendimiento de la extracción del aceite esencial de romero para evaluar el efecto de diferentes solventes. Se utilizó el método de arrastre con vapor de agua y la extracción con equipo Soxhlet con dos solventes (etanol y hexano). Se concluye que los métodos de extracción con solventes con hexano y etanol presentan un rendimiento de 21,2 % y 30,7 % respectivamente, pero que el aceite esencial obtenido con este método no es apto para utilizarse como antioxidante por sus características físicas y su consistencia.

En la segunda etapa experimental se determinó el carácter antioxidante del aceite esencial obtenido por el método funcional por medio del índice de peróxidos que consiste en la

valoración con una disolución patrón de tiosulfato de sodio pentahidratado con indicador de almidón de tres muestras de aceite de soya con distinto antioxidante. Se concluye que hasta los 8 días no existe suficiente evidencia para rechazar la hipótesis nula de igualdad de promedios, por lo tanto, la capacidad antioxidante del aceite esencial extraído por arrastre con vapor, es igual con un 95 % de confianza a la capacidad antioxidante del BHT utilizado.

En la tercera etapa experimental se realizó una cromatografía de gases al producto obtenido por el método seleccionado para caracterizar los componentes funcionales como antioxidantes en aceites comerciales, los principales componentes encontrados, de mayor a menor, fueron alfa-pineno, cineol, biciclo-hept-3-en-2-ona, linalool, canfeno y borneol.

Se recomienda realizar la extracción de aceites esenciales de otras plantas como orégano, menta hierbabuena y determinar su capacidad antioxidante. Además realizar pruebas anti microbianas y anti fúngicas para determinar de este modo la posible utilización de estos aceites esenciales como preservantes en alimentos y artículos de cuidado personal.

ÍNDICE GENERAL

Introducción.....	1
Antecedentes.....	1
Justificación.....	2
1. Capítulo 1.....	5
Aspectos generales.....	5
1.1 Romero.....	5
1.2. Aceites esenciales y características.....	6
1.3. Composición aceites esenciales.....	11
1.4. Extracción.....	13
1.5. Factores que afectan en la extracción del aceite.....	20
1.6. Aplicaciones de los aceites esenciales.....	21
1.7. Pruebas de calidad aceites esenciales.....	32
1.8. Análisis estadístico.....	38
2. Capítulo 2.....	40
Materiales, equipo y metodología.....	40
2.1. Materiales.....	40
2.2. Equipo.....	41
2.3 Metodología experimental.....	42
3. Capítulo 3.....	55
Análisis de resultados.....	55
3.1. Determinación del rendimiento del aceite esencial.....	55
3.2. Comprobación del método análisis de varianza para porcentaje de rendimiento.....	56
3.3. Determinación de la capacidad antioxidante del aceite esencial de romero.....	66
3.4. Comprobación del método análisis de varianza para la actividad antioxidante del aceite esencial de romero.....	67
3.5. Caracterización del aceite esencial obtenido por el método de arrastre con vapor y utilizado en las pruebas antioxidantes.....	73
4. Conclusiones y recomendaciones.....	77
a. Conclusiones.....	77
b. Recomendaciones.....	78
5. Nomenclatura.....	79
6. Bibliografía.....	80

7. Apéndices	88
Apéndice A: Datos experimentales	90
Apéndice B: Resultados intermedios.....	95
Apéndice C: Muestra de cálculo.....	96
Apéndice D: Procedimientos	97

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpénicos comunes en aceites esenciales (Stashenko, 2009).	9
Figura 1.2. Monoterpenos oxigenados comunes en aceites esenciales (Stashenko, 2009). .	10
Figura 1.3. Fenoles, éteres y cumarinas comunes en aceites esenciales (Stashenko, 2009).	11
Figura 1.4. Obtención de aceites esenciales por arrastre con vapor, agua- vapor e hidrodestilación (Stashenko, 2009).	17
Figura 2.1. Apariencia de los ramos de romero luego del secado a 40 °C.	44
Figura 2.2. Secador utilizado para secar las ramas frescas de romero.	45
Figura 2.3. Equipo utilizado en operación para llevar a cabo la extracción de aceite esencial por medio de equipo Soxhlet.	47
Figura 2.4. Calentador para extractor Soxhlet con solventes.	48
Figura 2.5. Equipo de destilación (rotavapor) en operación.	49
Figura 2.6. Equipo utilizado en operación para llevar a cabo la extracción de aceite esencial por medio arrastre con vapor.	51
Figura 2.7. Freidor utilizado para calentar el aceite hasta 180 °C.	53
Figura 3.1. Gráfica de intervalos de confianza para el análisis de varianza de un factor para el rendimiento del aceite esencial de romero por los métodos de extracción utilizados.	59
Figura 3.2. Gráfica de probabilidad normal para los residuos del análisis de varianza de un factor para el rendimiento del aceite esencial de romero por los métodos de extracción utilizados.	60
Figura 3.3. Gráfica de ajustes para residuos del análisis de varianza de un factor para el rendimiento del aceite esencial de romero por los métodos de extracción utilizados.	61
Figura 3.4. Histograma de los residuos para análisis de varianza de un factor para el rendimiento del aceite esencial de romero por los métodos de extracción utilizados.	61
Figura 3.5. Aceite esencial extraído por diferentes métodos. Método. a. Soxhlet con etanol b. Soxhlet con hexano. c. Arrastre con vapor.	65

Figura 3.6. Índice de peróxidos de un aceite de soya en función del tiempo con diferentes tratamientos antioxidantes.	66
Figura 3.7. Gráfica de probabilidad normal para los residuos del análisis de varianza de dos factores para el índice de peróxidos del aceite de soya analizado.	70
Figura 3.8. Gráfica de ajustes para residuos del análisis de varianza de un factor para el índice de peróxidos del aceite de soya analizado.	71
Figura 3.9. Histograma de los residuos para análisis de varianza de un factor para el índice de peróxidos del aceite de soya analizado.	72

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1. Ejemplos de plantas aromáticas y su clasificación según la familia de compuestos que prevalecen en su aceite esencial.....	7
Cuadro 1.2. Aceites esenciales con alto contenido de algunos compuestos constituyentes... 8	8
Cuadro 1.3. Disolventes de extracción con densidades menores que el agua comúnmente utilizados.....	15
Cuadro 1.4. Disolventes de extracción con densidades mayores que el agua comúnmente utilizados.....	16
Cuadro 1.5. Ventajas y desventajas de los principales métodos de extracción de aceites esenciales.	19
Cuadro 1.6. Sectores y ramas donde se utilizan aceites esenciales y productos derivados y los aceites esenciales utilizados.	22
Cuadro 1.7. Detectores de cromatografía de gases utilizados en el análisis de aceites esenciales y sus aplicaciones.	34
Cuadro 2.1. Reactivos utilizados en el desarrollo experimental del proyecto.....	41
Cuadro 2.2. Equipos utilizados en el desarrollo experimental del proyecto.	42
Cuadro 2.3. Condiciones de operación para extracción de aceite esencial de romero con el método Soxhlet.	46
Cuadro 2.4. Condiciones de operación para extracción de aceite esencial de romero con el método arrastre con vapor.	50
Cuadro 2.5. Condiciones de operación para la determinación de la propiedad antioxidante del aceite esencial de romero extraído.....	52
Cuadro 3.1. Porcentaje de rendimiento de extracción de aceite esencial de romero por medio de tres métodos.	55
Cuadro 3.2. Estadísticos calculados para el porcentaje de rendimiento para cada uno de los métodos de extracción de aceite esencia utilizado.....	56
Cuadro 3.3. Análisis de varianza de un factor realizado para el porcentaje de rendimiento de aceite esencial con un 95 % de confianza ($\alpha=0,05$).	58
Cuadro 3.4. Análisis de medias para el porcentaje de rendimiento de aceite esencial con un 95 % de confianza ($\alpha=0,05$).	58

Cuadro 3.5. Características sensoriales y de proceso de los aceites esenciales obtenidos por los metodos evaluados para la toma de decisión.	62
Cuadro 3.6. Análisis de varianza realizado para el índice de peróxidos de aceite de soya con diferentes tratamientos en el tiempo, con un 95 % de confianza ($\alpha=0,05$).	68
Cuadro 3.7. Análisis de medias por medio de la prueba de Tukey para el índice de peróxidos con tres tratamientos.	68
Cuadro 3.8. Composición del aceite esencial extraído por arrastre con vapor determinada por medio de cromatografía de gases.	73

Introducción

Antecedentes

La demanda por productos naturales va en aumento progresivo, lo mismo que las exigencias de los mercados internacionales. Por ello existe la necesidad de evaluar alternativas naturales para disminuir o eliminar el uso de antioxidantes sintéticos (Neira *et al.*, 2003).

El área específica en la que se desarrolla este proyecto corresponde a la extracción de productos naturales con solventes, por tanto, el objetivo general es evaluar las mejores condiciones experimentales para la extracción de aceite esencial de romero para utilizar como antioxidante en aceites comerciales. Para lograr este fin se extrae el aceite esencial con tres disolventes diferentes que son hexano, etanol y vapor de agua.

La industria de aceites esenciales está estrechamente relacionada no solo con el sector productivo y tecnológico- destilación, refinería y transformación-, sino con el desarrollo agrícola, el establecimiento y manejo de cultivos industriales de plantas aromáticas y materia prima para la obtención de aceites (Stashenko, 2009).

Aunque los aceites esenciales poseen un volumen de producción anual relativamente pequeño en comparación con el petróleo, gas natural, aceites vegetales, biocombustibles, polímeros y fertilizantes, estos gozan de un valor agregado muy alto. Son mezclas que correctamente almacenadas no tienen fecha de caducidad (Stashenko, 2009).

El cultivo de plantas aromáticas y la extracción de aceites esenciales son actividades agrícolas que permiten, entre otros beneficios: utilización más eficiente de la tierra a través de cultivos intercalados (cacao, café, caucho con plantas aromáticas), generación de fuentes de trabajo y de ingresos para agricultores, obtención de productos naturales de alto valor agregado con base en la unión de tecnología (procesos de destilación y purificación) y actividad agrícola (propagación de cultivos y cosecha de plantas), además contribuye al desarrollo de la cadena productiva y de valor de plantas medicinales en Costa Rica (Stashenko, 2009).

La extracción de un aceite esencial puede ser atractiva para su producción y comercialización debido a diferentes razones, entre las que figuran:

- Posee propiedades sensoriales excepcionales que pueden ser aprovechadas en diferentes productos finales como perfumes, cremas, aromatizantes y saborizantes (Stashenko, 2009).
- Su producción es muy rentable y el rendimiento de la plantas es muy alto lo que puede reemplazar aceites más costosos, porque el aceite presenta propiedades biológicas interesantes por ejemplo propiedades antioxidantes, anti bacterianas o antifúngicas, lo que puede ser aprovechado para su uso en diferentes formulaciones de productos finales como fármacos, cosméticos, productos de aseo personal y alimentos (Stashenko, 2009).
- El aceite puede contener en alta concentración de un compuesto que puede ser aislado y utilizado como reactivo de partida en la síntesis orgánicas para obtener de esta forma, nuevas moléculas aromatizantes, saborizantes o agente farmacológicos (Stashenko, 2009).

Justificación

Aunque a menudo los efectos nocivos de las sustancias sintéticas no son extrapolables a la especie humana, los consumidores perciben que las sustancias naturales son más inocuas que las sintéticas y, por ello, las prefieren. Ante esto, varias investigaciones están buscando, en las fuentes naturales, nuevas sustancias con propiedades beneficiosas para la salud, que puedan reemplazar a los productos sintéticos comúnmente utilizados; claro está, después de un estudio exhaustivo de sus propiedades fisicoquímicas y toxicológicas (Tafurt, Martínez & Stashenko, 2005).

En los países en desarrollo como el nuestro, una parte de la población no tiene acceso a medicamentos industrializados constituyendo por esta razón el uso de medicamentos naturales, incluidos aceites esenciales como el único recurso terapéutico disponible para la población más pobre en estos países (Dhatapin, 2000).

Las plantas aromáticas, como el romero, han sido utilizadas durante siglos en perfumería, alimentos y medicamentos, en la vida culinaria se utilizan de forma seca como condimentos

y especias, además en industria se utilizan como aromatizantes en productos de higiene como jabones y cremas, aromatizantes y saborizantes en productos alimenticios como embutidos, componentes de formulaciones veterinarias y farmacéuticas y como antimicrobianos, repelentes, insecticidas y anti fúngicos, por lo tanto es importante investigar la extracción de aceites esenciales y su aplicación en diferentes productos comerciales (Sharapin, 2005).

El uso de extractos vegetales como insecticidas botánicos para el control de plagas agrícolas es una práctica ancestral que data de al menos dos milenios, en antiguas civilizaciones como las de China, Egipto, Grecia e India. Cada año es mayor el número de plantas que se estudian con esta finalidad y el de formulaciones comerciales que se presentan en los mercados (Romeu, Botta, & Díaz, 2007).

No se debe olvidar que los remedios a base de plantas medicinales presentan una inmensa ventaja con respecto a los tratamientos químicos. En las plantas los principios activos se hallan siempre biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias, que van a potenciarse entre sí, de forma que en general no se acumulan en el organismo, y sus efectos indeseables están limitados. Sin embargo, a pesar de que han aumentado las investigaciones y estudios científicos de las plantas medicinales, todavía no se conocen muchos de los principios activos a los que deben las plantas sus extraordinarias cualidades (Estrada, 2010).

En los últimos años, la aromaterapia ha tenido un gran crecimiento y aceptación en el mercado mundial. La comercialización de los aceites esenciales puros, como ingredientes de los productos de aromaterapia, ha creado una mayor demanda y ha motivado la búsqueda de nuevos aromas, más exóticos y con propiedades pseudo-farmacológicas. Otras aplicaciones nuevas surgidas últimamente y con un gran potencial futuro son de ingredientes para la formulación de biocidas (Stashenko, 2009).

Las hojas de romero se utilizan para dar sabor a los alimentos como condimento. Desde la antigüedad el romero se ha utilizado en la medicina popular para múltiples condiciones médicas. Este se ha utilizado como antiespasmódico en el cólico renal y la dismenorrea y en el alivio de trastornos respiratorios. También se ha utilizado como analgésico,

antirreumático, carminativo, colágeno, diurético, expectorante, antiepiléptico y para los efectos en la fertilidad humana. Otros usos son como tónico general en el caso de obras físicas o intelectuales excesivos y en las enfermedades del corazón; y también como un insecticida y herbicida. Externamente, es un rubefaciente, y se usa para estimular el crecimiento del cabello y el tratamiento de eczema del cuero cabelludo, hierve y heridas (Romeu, Botta & Diaz, 2007). Por sus múltiples aplicaciones, el romero es una planta que debe ser investigada para corroborar las múltiples aplicaciones que se le achacan y descubrir otras que aún no se han descubierto.

La extracción con solventes corresponde a una operación unitaria de interés en la Ingeniería Química. La extracción con disolventes es la técnica de separación de un compuesto a partir de una mezcla sólida o líquida, aprovechando las diferencias de solubilidad de los componentes de la mezcla en un disolvente adecuado (Wankat, 2008). Dicho proceso corresponde la extracción de aceite esencial de romero que se pretende analizar con el objetivo de mejorar su actual funcionamiento, estudiando las condiciones que permitan obtener un proceso de mayor eficiencia.

Capítulo 1

Aspectos generales

1.1 Romero

El romero (*Rosmarinus officinalis*) es una planta común en muchas partes del mundo que pertenece a la familia de las labiadas. Es un arbusto ramificado siempre verde espeso, alcanza una altura de aproximadamente un metro con tallos rectos, flores axilares melíferas blanquecinas azul de 5mm de largo y hojas de color verde oscuro que son pequeñas con bordes vueltos hacia atrás, opuestas y sésiles. Crece a lo largo de las costas norte y sur del Mediterráneo, y también en las áreas sub-Himalaya. Se ha cultivado desde la antigüedad en Inglaterra, Alemania, Francia, Dinamarca y otros países escandinavos, además en Centroamérica, Venezuela y Filipinas (Muñoz, 2002).

Se utiliza para dar sabor a los alimentos, una bebida, así como en los cosméticos; en la medicina popular se utiliza como antiespasmódico en el cólico renal y dismenorrea, en el alivio de trastornos respiratorios y para estimular el crecimiento del cabello. El extracto de romero relaja músculos lisos de la tráquea y el intestino, y tiene colerético, hepatoprotector y la actividad anti tumorigénica. Los constituyentes más importantes de romero son el ácido cafeico y sus derivados tales como el ácido rosmarínico. Estos compuestos tienen efecto antioxidante. El compuesto fenólico, ácido rosmarínico, obtiene uno de sus anillos fenólicos a partir de fenilalanina a través de ácido cafeico y el otro de tirosina a través de ácido láctico-dihidroxifenil. El ácido rosmarínico se absorbe bien en el tracto gastrointestinal y en la piel. Aumenta la producción de prostaglandina E2 y reduce la producción de leucotrieno B4 en leucocitos polimorfonucleares humanos. Los derivados del ácido de romero y de sus componentes especialmente cafeico tales como ácido rosmarínico tienen un potencial terapéutico en el tratamiento o prevención del asma bronquial, trastornos espasmogénicos, úlcera péptica, enfermedades inflamatorias, la

hepatotoxicidad, la aterosclerosis, la enfermedad isquémica del corazón, cataratas, cáncer y pobre movilidad de los espermatozoides (Sereitia, 1999).

1.1.1. Aspectos silviculturales

El romero crece en todo tipo de suelos, preferiblemente los secos y algo arenosos y permeables, adaptándose muy bien a los suelos pobres. Crece en zonas litorales y de montaña baja (laderas y collados), desde la costa hasta 1.500 msnm. A más altura, da menor rendimiento en la producción de aceite esencial. Forma parte de los matorrales que se desarrollan en los sitios secos y soleados en las zonas de encinar, zonas degradadas por la tala o quema y laderas pedregosas y erosionadas. Florece dos veces al año, en primavera y en otoño (Muñoz, 2002).

1.2. Aceites esenciales y características

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (saborizantes) (Martínez, 2003).

Los aceites esenciales son metabolitos secundarios de las plantas por lo que un metabolismo más activo puede asociarse con una mayor producción de aceites. En un aceite esencial pueden encontrarse hidrocarburos alicíclicos y aromáticos, así como sus derivados oxigenados (alcoholes, aldehídos, cetonas y ésteres), sustancias azufradas y nitrogenadas. Los compuestos más frecuentes se derivan del ácido mevalónico y se les clasifica en monoterpenoides y sesquiterpenoides. Algunos autores señalan que la gran variabilidad en la composición química de los aceites esenciales es debida, sobre todo, al origen del material más que a la influencia del medio ambiente. Otros autores otorgan un papel más preponderante al medio ambiente, sobre todo en lo referente a densidad de planta sembrada, estación del año en el corte y a la cantidad de agua usada en el riego, o incluso a la cantidad de luz artificial o natural usada en el cultivo de la planta en invernadero (Arcila, Loarca, González & Lecona, 2004). Los aceites esenciales presentan en la planta una función protectora química contra depredadores, insectos, microorganismos (bacterias, virus,

hongos), además de remedios vegetales que la planta exuda cuando está lesionada, experimenta un estrés o está infectada. Muchas de estas sustancias son repelentes de insectos o contrario a esto más bien los atrae. Además existen compuestos anti alimentarios es decir crean una sensación desagradable en herbívoros para que dejen de comerse la planta. Las sustancias volátiles que atraen insectos son imprescindibles para la polinización y la reproducción, además estos participan en el proceso de respiración de la planta, ayudan a regular la humedad y cumplen diversas funciones fisiológicas (Stashenko, 2009).

Los aceites esenciales son inocuos mientras la dosis no supere los límites de toxicidad y sufren degradación química en presencia de la luz solar, del aire, del calor, de ácidos y álcalis fuertes, generando oligómeros de naturaleza indeterminada. Además, son solubles en disolventes no polares y casi inmiscibles en disolventes polares como el agua, son considerados GRAS por la Agencia de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (Stashenko, 2009). En el Cuadro 1.1 se muestra los componentes principales presentes en aceites esenciales extraídos de diferentes plantas.

Cuadro 1.1. Ejemplos de plantas aromáticas y su clasificación según la familia de compuestos que prevalecen en su aceite esencial.

Clase de compuestos	Especies vegetales
Monoterpenos	Romero, salvia, geranio, citronela, palmarrosa, albahaca, rosa, pino, eucalipto, cítricos, ciprés, lavanda y menta
Sesquiterpenos	Patchouli, cúrcuma, jengibre, copaiba, cedro, clavo, mirra, manzanilla
Compuestos fenólicos y oxigenados no terpénicos	Eneldo, anís, tomillo, orégano, ylang-ylang, pimienta, canela, ajedrea, narciso, anís estrella.

Fuente: (Stashenko, 2009)

En el Cuadro 1.2 se especifican los distintos tipos de componentes químicos encontrados en distintos aceites esenciales de diferentes plantas aromáticas.

Cuadro 1.2. Aceites esenciales con alto contenido de algunos compuestos constituyentes.

Compuestos	Especies
Monoterpenos: Limoneno, α y β pinenos, γ -terpineno, β -mirceno, α y β felandrenos, Δ -careno, p-cimeno, trans- β -ocimeno	Grapefruit, naranja, limón, mandarina, nuez moscada, pino, bergamota, romero, abeto, lavanda y ciprés.
Sesquiterpenos: Farnesol, viridiflorol, santalol, eudesmol, cedrol, vertiverol, vetivol y acetatos	Jazmín, ylang-ylang, sándalo, jengibre, vetiver y manzanilla
Monoterpenoles y sus esteres: Linalool, mirtenol, terpinen-4-ol, mentol, geraniol, citronelol, nerol, α -terpineol, 1,8-cineol, sabinol y sus formiatos, acetatos y butiratos.	Albahaca, lavanda, palo de rosa, mejorana, mentas, palmarrosa, citronela, geranio, rosa, limonaria, té, nerolí, eucalipto, cardamomo, mirto, angélica y ajenjo.
Sesquiterpenoles y sus esteres: Farnesol, viridiflorol, santalol, eudesmol, cedrol, vetiverol, vetivol y sus acetatos.	Jazmín, ylang-ylang, sándalo, jengibre vetiver y manzanilla.
Compuesto fenólicos y sus éteres: Timol, carvacrol, eugenol, isoeugenol, chavicol, acetato de eugenilo, metilchavicol (estragol), anetol.	Tomillo, orégano, tagetes, canela, tarragón, albahaca, rosa, hinojo, anís, pimienta, anís estrella, clavo, ajedrea.
Aldehídos terpénicos: Citronelal, neral, geranial, farnesal, canfenal, sinensal	Eucalipto, citronela, melisa, limonaria, jengibre, limón, naranja, lima, canela.
Cetonas terpénicas : Mentonas, alcanfor, tuyona, fenchona, carvona, dihidrocarvona, pirocarvona, piperitenona, pulegona, piperitona, turmerona, ar-turmerona	Mentas, geranio, romero, salvia lavanda, eneldo, tanaceto, ejenjo, <i>Buchu</i> , alcanforero, alcaravea, isopo, salvia cúrcuma.
Compuestos oxigenados no terpénicos : Alcohol 2-feniletílico, benzoato de bencilo, 6-metil-5-hepten-2-ona, 2-undcanona, acetato de cinamilo, safrol, cumarina, umbeliferona, trans-2-hexenal, aldehído cinámico	Rosa, ylang-ylang, canela melisa, ruda, casia, narciso, tarragón, tonca, eneldo, canela, <i>Piper</i>

Fuente: (Stashenko, 2009)

En la Figura 1.1 se muestra los principales monoterpenos y sesquiterpenos presentes en aceites esenciales extraídos de plantas aromáticas.

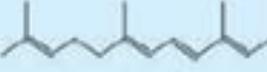
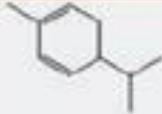
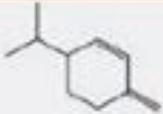
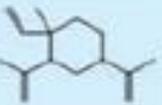
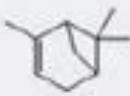
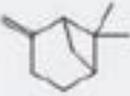
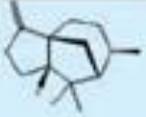
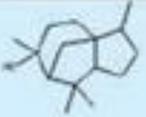
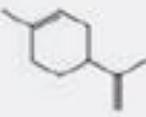
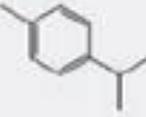
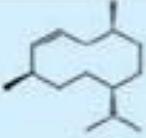
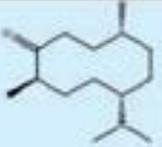
Monoterpenos (n = 2)		Sesquiterpenoides (n = 3)	
 β-Mirceno	 Ocimeno	 Farneseno	 Farnesol
 α-Felandreno	 β-Felandreno	 Nerolidol	 Elemeno
 α-Pineno	 β-Pineno	 Cedreno	 Cedrol
 Limoneno	 p-Cimeno	 Germacreno	 Germacrona

Figura 1.1. Hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpénicos comunes en aceites esenciales (Stashenko, 2009).

En la Figura 1.2 se muestran los principales monoterpenos oxigenados (alcoholes, aldehídos, cetonas y otros) encontrados en aceites esenciales de plantas aromáticas.

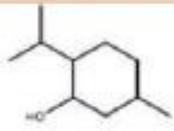
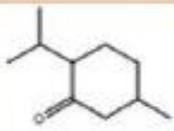
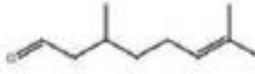
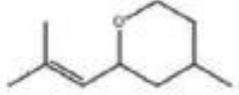
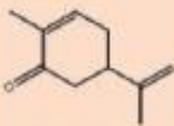
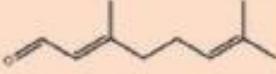
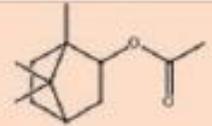
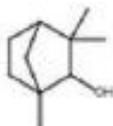
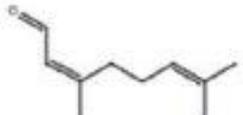
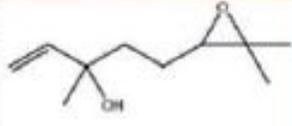
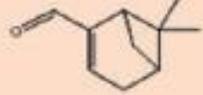
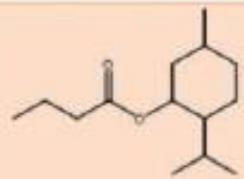
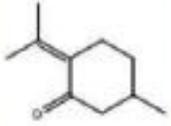
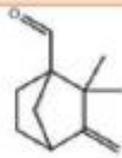
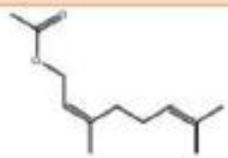
Alcoholes	Cetonas	Aldehídos	Otros
 Mentol	 Mentona	 Citronelal	 Óxido de rosa
 Borneol	 Carvona	 Geranial	 Acetato de bornilo
 Fenchol	 Alcanfor	 Neral	 Óxido de linalool
 Linalool	 Verbenona	 Mirtenal	 Butirato de mentilo
 Geraniol	 Pulegona	 Canfenal	 Acetato de nerilo

Figura 1.2. Monoterpenos oxigenados comunes en aceites esenciales (Stashenko, 2009).

Por otra parte, en la Figura 1.3 se incluye los más importantes compuesto no terpénicos oxigenados (fenoles, éteres y cumarinas) presentes en aceites esenciales de planta aromáticas.

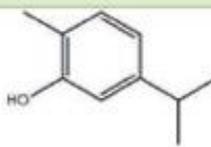
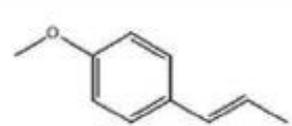
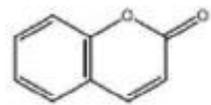
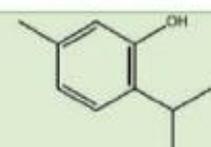
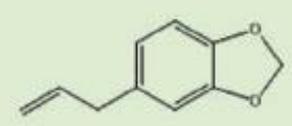
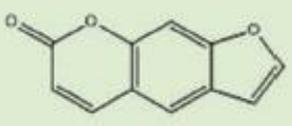
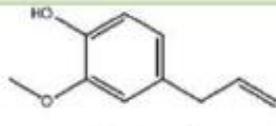
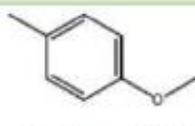
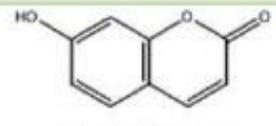
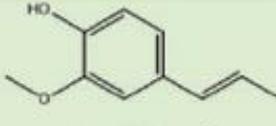
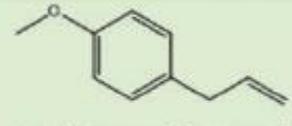
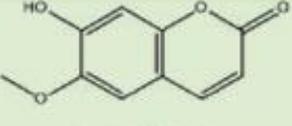
Compuestos oxigenados no terpénicos		
Fenoles	Éteres	Cumarinas
 Carvacrol	 <i>trans</i> -Anetol	 Cumarina
 Timol	 Safrol	 Psoraleno
 Eugenol	 <i>p</i> -Cresil metil éter	 Umbeliferona
 Isoeugenol	 Metil chavicol (estragol)	 Escopoletina

Figura 1.3. Fenoles, éteres y cumarinas comunes en aceites esenciales (Stashenko, 2009).

1.3. Composición aceites esenciales

Las condiciones agroecológicas del cultivo, tipo de planta, tipo de suelo, desarrollo de la planta, lugar de cultivo y los parámetros operacionales del proceso de extracción son las variables que inciden sobre la composición y el rendimiento de los aceites esenciales. Las variaciones en las condiciones agroecológicas inducen cambios morfológicos, histológicos y fisiológicos en la planta, mientras que la eficiencia de la extracción está relacionada con los parámetros operacionales, tales como tiempo, temperatura de la extracción y cantidad de agua empleada, entre otros. Adicionalmente, teniendo en cuenta que los aceites esenciales obtenidos mediante hidrodestilación, normalmente presentan notas más fuertes y un color más oscuro con respecto a los producidos por otros métodos, se recomienda el uso

suplementario de presiones reducidas, lo cual puede contribuir al no deterioro de los constituyentes del aceite esencial durante la extracción (Romeu, Botta & Diaz, 2007).

Los aceites esenciales pueden encontrarse en diferentes partes células oleíferas (jengibre, cúrcuma, vainilla), en canales secretorios (pino, anís, artemisa), glándulas (cítricos y eucalipto), o en los tricomas (labiadas, solanáceas, asteráceas). Este material al ser sometido al vapor de agua libera una mezcla odorífera líquida con gran variedad de sustancias volátiles que recuerdan al olor de la planta pero más concentrado, esta mezcla está compuesta por hidrocarburos terpénicos y sus derivados oxigenados, alcoholes, aldehídos y cetonas, así como éteres, ésteres, compuestos fenólicos y sus éteres, cumarinas, fumarocumarinas y fenilpropanoides. Este se puede encontrar en flores (jazmin, rosa), corteza (sándalo, canela), hojas (albahaca, menta, romero), raíces (cáñamo, valeriana), cáscaras (mandarina, naranja) y frutos (anís, nuez moscada) (Stashenko, 2009).

Los componentes principales del aceite esencial de romero son: alcanfor, 1,8-cineol, apineno y otros monoterpenos como borneol, b-pineno, limoneno y p-cimeno. También encontramos lactonas sesquiterpénicas (carnosol, rosmanol, epirosmanol, isorosmanol, metoxirosmanol, rosmadial); ácidos triterpénicos (ácido ursólico, ácido betulínico); alcoholes triterpénicos (alfa y beta-amirina, betulina); ácidos fenólicos (cafeico, clorogénico, rosmarínico); flavonoides (luteolina, apigenina, genkwanina, diosmetina, hispidulina, 5-hidroxi-7, 4'-dimetoxi-flavona, cirsimaritina) y los correspondientes heterósidos (Muñoz, 2002).

Un quimiotipo es cuando el aceite esencial de una especie de planta presenta una composición química distinta al de otra planta de la misma especie. Para diferenciar una planta de la otra se utiliza el término quimiotipo, que deriva de: tipo químico. Esto significa que plantas de la misma especie se diferencian entre sí en cuanto a que presenta una composición química distinta en sus aceites esenciales (Romero, 2004). En el aceite esencial de romero se han diferenciado tres quimiotipos diferentes: *cineoliferum* (alto porcentaje de 1,8-cineol), *camforiferum* (con más de un 20 % en alcanfor) y *verbenoniferum* (con más de un 15 % en verbenona). En el área mediterránea el aceite esencial de plantas procedentes de Marruecos y Túnez posee un elevado contenido en 1,8-cineol, mientras que el procedente de España posee un contenido menor (Muñoz, 2002).

El rendimiento de la extracción del aceite esencial de romero es de 1,7 % aproximadamente y su composición es alcanfor (18 %), 1,8-cineol (21,5 %) y alfa-pineno (15,3 %) aunque existen variedades entre poblaciones de los cuales el 1,8-cineol y el alfa-pineno presenta propiedad antioxidante (Romeu, Botta & Diaz, 2007).

Para analizar los aceites esenciales se utiliza cromatografía de gases como técnica para identificar los diferentes componentes de estos, este análisis permite caracterizar los quimiotipos basándose en los compuestos mayoritarios encontrados (Pino *et al.*, 2010).

El aceite esencial de romero es un aceite aromático que se obtiene por destilación al vapor de las hojas frescas y las flores de la planta. Es un líquido incoloro o amarillo pálido, con el olor característico de la planta. Es un ingrediente para perfumes, tónicos para el cabello, loción para el cabello, crema fría, etc. Este aceite ha generado un gran interés y su aceite volátil, extractos y algunos de sus componentes aislados han sido objeto de muchas investigaciones farmacológicas (Romeu, Botta & Diaz, 2007).

1.4. Extracción

La extracción es una operación unitaria donde se eliminan uno o más componentes de un líquido o sólido transfiriéndolo (s) a una segunda fase líquida. Las dos fases pueden ser completa o parcialmente inmiscibles. El proceso de extracción comprende la unidad de extracción y un proceso de recuperación del disolvente utilizado. En muchas aplicaciones el paso posterior de recuperación del solvente (destilación o arrastre químico) es más costoso que la misma extracción. Es posible utilizar diversas cascadas de extracción tanto en contra corriente (más común) como en co-corriente o flujo cruzado (Wankat, 2008).

1.4.1. Extracción sólido –líquido

La separación de una mezcla de compuestos sólidos también se puede llevar a cabo aprovechando diferencias de solubilidad de los mismos en un determinado disolvente. En el caso favorable de una mezcla de sólidos en la cual uno de los compuestos es soluble en un determinado disolvente (normalmente un disolvente orgánico), mientras que los otros son insolubles, podemos hacer una extracción consistente en añadir este disolvente a la mezcla contenida en extractor, en frío o en caliente, agitar o triturar y separar por filtración la

disolución que contiene el producto extraído y la fracción insoluble que contiene las impurezas. Si, al contrario, lo que se pretende es disolver las impurezas de la mezcla sólida, dejando el producto deseado como fracción insoluble, el proceso, en lugar de extracción, se denomina lavado. Existe extracción sólido-líquido continua y discontinua siendo la discontinua mucho más eficiente (Wankat, 2008).

1.4.2. Extracción líquido-líquido

La extracción líquido-líquido es un método muy útil para separar componentes de una mezcla. El éxito de este método depende de la diferencia de solubilidad del compuesto a extraer en dos disolventes diferentes. Cuando se agita un compuesto con dos disolventes inmiscibles, el compuesto se distribuye entre los dos disolventes. A una temperatura determinada, la relación de concentraciones del compuesto en cada disolvente es siempre constante, y esta constante es lo que se denomina coeficiente de distribución o de reparto (Wankat, 2008).

Es frecuente obtener mezclas de reacción en disolución o suspensión acuosa, en estas situaciones, la extracción del producto de reacción deseado a partir de esta mezcla acuosa se puede conseguir añadiendo un disolvente orgánico, que sea inmiscible con el agua y capaz de solubilizar la máxima cantidad de producto a extraer. Después de agitar la mezcla de las dos fases para aumentar la superficie de contacto entre ellas y permitir un equilibrio más rápido del producto a extraer entre las dos fases, se producirá una transferencia del producto deseado desde la fase acuosa inicial hacia la fase orgánica, en una cantidad tanto mayor cuanto mayor sea su coeficiente de reparto entre el disolvente orgánico de extracción elegido y el agua. Las dos fases se separan de nuevo, espontáneamente por decantación, la posición relativa de ambas fases depende de la relación de densidades entre estas. Dado que después de esta extracción, la fase acuosa frecuentemente aún contiene cierta cantidad del producto deseado, se suele repetir el proceso de extracción un par de veces más con disolvente orgánico puro (Wankat, 2008).

Una vez finalizada la operación de extracción, se tiene que recuperar el producto extraído a partir de las fases orgánicas reunidas. Para ello, se tiene que secar la fase orgánica resultante con un agente desecante, filtrar la suspensión resultante y finalmente eliminar el

disolvente orgánico de la disolución seca conteniendo el producto extraído por destilación o evaporación (Wankat, 2008).

1.4.3. Características del disolvente de extracción

La extracción selectiva de un componente de una mezcla disuelta en un determinado disolvente se puede conseguir añadiendo otro disolvente que cumpla las siguientes condiciones: que no sea miscible en el otro disolvente, que el compuesto de interés sea mas soluble en el otro disolvente que en original, que las impurezas no sean solubles en el disolvente de extracción, sea suficientemente volátil, no sea tóxico e inflamable (Wankat, 2008). En el Cuadro 1.3 se muestran los disolventes con densidades menores al agua utilizados en la extracción selectiva de componentes.

Cuadro 1.3. Disolventes de extracción con densidades menores que el agua comúnmente utilizados.

Nombre	Fórmula	Densidad (g/mL)	Punto de ebullición (°C)	Peligrosidad
Éter dietílico	$(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{O}$	0,7	35	Muy inflamable, tóxico
Hexano	C_6H_{14}	$\approx 0,7$	> 60	Inflamable
Benceno	C_6H_6	0,9	80	Inflamable, tóxico, carcinógeno
Tolueno	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$	0,9	111	Inflamable
Acetato de etilo	$\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$	0,9	78	Inflamable, irritante

Fuente: (Pasto & Johnson, 2003)

Por otro lado en el Cuadro 1.4 se observan solventes con densidades mayores a la del agua utilizados en la extracción selectiva de componentes.

Cuadro 1.4. Disolventes de extracción con densidades mayores que el agua comúnmente utilizados.

Nombre	Fórmula	Densidad (g/mL)	Punto de ebullición (°C)	Peligrosidad
Diclorometano	CH ₂ Cl ₂	1,3	41	Tóxico
Cloroformo	CHCl ₃	1,5	61	Tóxico
Tetracloruro de carbono	CCl ₄	1,6	77	Tóxico

1.4.4. Métodos de extracción de aceites esenciales

Los aceites esenciales se pueden extraer por 5 métodos diferentes:

1. Arrastre por vapor: este proceso se lleva a cabo con vapor sobrecalentado que penetra la materia vegetal a presión, la presión rompe las células de la planta y arrastra los volátiles que se condensan al atravesar un medio refrigerante (condensador). Lo anterior se logra por la inyección de vapor de agua directamente en el seno de la mezcla, pero su función no es la de solo arrastra el volátil sino que se condensa y forma una fase inmiscible que cede calor a la mezcla a destilar. En este método se tiene la presencia de dos fases inmiscibles a lo largo del condensador una acuosa y otra orgánica. La condición más importante para que este proceso se lleve a cabo es que el componente volátil sea insoluble en agua ya que el productos destilado forme dos fases al condensarse (Stashenko, 2009).

Generalmente los aceites esenciales son más livianos que el agua e insolubles en esta por lo tanto se pueden separar por decantación. Este método se utiliza para extraer el aceite de raíces, rizomas, semillas (jengibre, valeriana, anís) y de hojas secas. El vapor tiende a recalentarse por la resistencia opuesta a su paso por el material y esto debe evitarse en lo posible, debido a que seca las membranas celulares e impide la salida del aceite. Las

instalaciones para la extracción por arrastre con vapor de agua son más costosas, pero presentan mayores producciones (Arango, Hurtado, Castillo & Santacruz, 2009).

En la destilación por arrastre de vapor los factores como el tamaño de partícula del material vegetal, el factor de empaquetamiento y el tiempo de extracción influyen en la composición y rendimiento de los aceites obtenidos. Estudiando el efecto del tamaño de partícula y el tiempo de extracción en el rendimiento del aceite esencial, se ha observado un mayor rendimiento cuando se trabaja con menores tamaños de partícula y tiempos de extracción prolongados (Arango, Hurtado, Castillo & Santacruz, 2009).

2. Destilación agua-vapor: en este método se emplea vapor húmedo proveniente de agua en ebullición que traspasa el material suspendido encima y apoyado sobre una malla, se puede utilizar para hojas, tallos, rizomas y raíces. Trabaja cerca de los 100°C cuando lo hace a 101,3 kPa y el rendimiento es bueno siempre y cuando no se presenten apelmazamientos. Por cargarse el material a una temperatura menor a la de trabajo, se producen condensaciones sobre él y ésta humedad origina cierta dificultad en la operación, especialmente en el paso y distribución del vapor por la muestra. Por su sencillez, bajo costo y rendimientos, esta técnica es la más usada en la industria de aceites esenciales. Varias farmacéuticas la recomiendan como el método óptimo de obtención de esencias (Stashenko, 2009). En la Figura 1.4 se ilustra el método de destilación agua- vapor, arrastre con vapor e hidrodestilación.

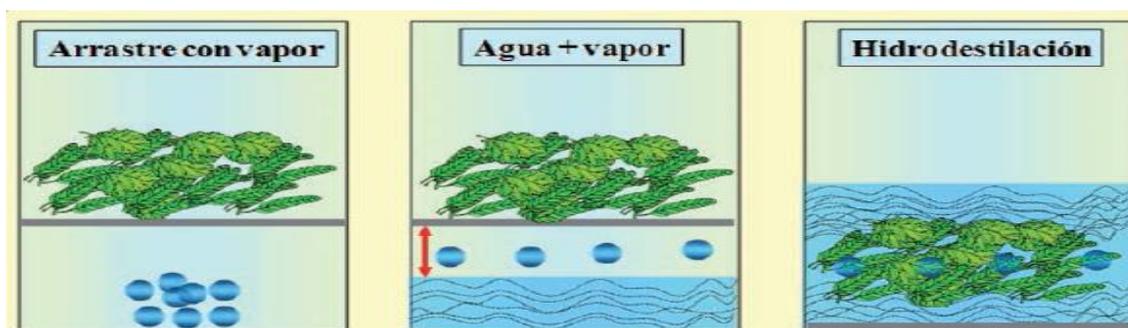


Figura 1.4. Obtención de aceites esenciales por arrastre con vapor, agua- vapor e hidrodestilación (Stashenko, 2009).

3. Hidrodestilación: el material se sumerge en agua directamente y se calienta hasta que hierva. Se utiliza para material vegetal delicado como flores (ilang ilang, rosas). En éste método es máxima la acción del agua sobre el material, por ello se puede presentar hidrólisis y oxidaciones. Útil para materiales que tienden al apelmazamiento (flores pequeñas). Es aconsejable cargar el agua ya caliente para disminuir la hidrólisis y el tiempo de operación. Los vapores heterogéneos se condensan y el aceite esencial se separa por diferencia de densidad. Los aceites producidos son más coloreados, que los obtenidos por arrastre con vapor, y tienden a presentar un cierto olor a quemado. Por lo anterior estos aceites siempre van a requerir una etapa posterior de refinación. Este método se utiliza para eucalipto, citronella y limonaria (Stashenko, 2009).

4. Extracción con solventes: Es un método en caliente, que se desarrolla empleando solventes con puntos de ebullición bajo, para evitar la degradación de la muestra. Conveniente para obtener los extractos crudos de las plantas. El material previamente debe de ser molido, macerado o picado, para permitir mayor área de contacto entre el sólido y el solvente. El proceso ha de buscar que el sólido, el líquido, o ambos, estén en movimiento continuo (agitación), para lograr mejor eficiencia en la operación. Se realiza preferiblemente a temperatura y presión ambientes. El proceso puede ejecutarse por batch (por lotes) o en forma continua (percolación, lixiviación, extracción tipo soxhlet). Los solventes más empleados son: etanol, metanol, isopropanol, hexano, ciclohexano, tolueno, xileno, ligroína, éter etílico, éter isopropílico, acetato de etilo, acetona, cloroformo; no se usan clorados ni benceno por su peligrosidad a la salud. Los solventes se recuperan por destilación y pueden ser reutilizados. El solvente adicionalmente extrae otros componentes como colorantes, gomas, mucílagos, ceras, grasas, proteínas, carbohidratos (Peredo *et al.*, 2009).

En la etapa de recuperación de los solventes (atmosférica o al vacío), después de los condensadores se debe disponer de un fluido refrigerante para evitar la pérdida de solvente. Los disolventes utilizados en este método tienen importantes restricciones en cuanto a residuos máximos que pueden dejarse cuando los aceites extraídos son materia prima para productos farmacéuticos y alimenticios. Los extractos obtenidos con este método suelen ser más oscuros ya que llegan a arrastrar algunos pigmentos esto se puede atenuar utilizando

alcoholes diluidos. El disolvente utilizado en la extracción se filtra y se evapora a presión atmosférica o vacío. Los restos de disolvente se deben separar a muy baja temperatura (Peredo *et al.*, 2009).

5. Extracción por prensado: En este método, el vegetal es sometido a presión en prensas tipo batch o continuas con un tornillo sin fin alta o baja presión, un extractor expeller y rodillos de prensa. Este método se utiliza para extraer el aceite de cítricos con una esponja. Otro método corresponde al raspado donde las frutas se pone a girar en un torno y se raspa la corteza únicamente, del sistema cae agua en forma de rocío que arrastra el aceite liberado. Otro proceso emplea una máquina de abrasión similar a una peladora de papas, y también utiliza rocío de agua. En estos procesos la mezcla detritos-agua-aceite se centrifuga a 5000 rpm durante 40 minutos y el aceite esencial recuperado se coloca en una nevera a 3°C durante 4 horas, para solidificar gomas y ceras que se localizan en la superficie. El aceite esencial se guarda en recipientes oscuros a 12 °C. Los aceites obtenidos por prensado y/o raspado, se les comercializa como “expresión en frío” y cumplen la funciones de odorizantes y saborizantes (Sánchez, 2006).

En el Cuadro 1.5 se detallan las ventajas y desventajas de algunos métodos de extracción de aceites esenciales.

Cuadro 1.5. Ventajas y desventajas de los principales métodos de extracción de aceites esenciales.

Método de extracción	Ventajas	Desventajas
Extracción con CO ₂ supercrítico	Alto rendimiento, ecológicamente limpio, bajas temperaturas de extracción por lo tanto no hay alteración química del aceite y cambiando parámetros operacionales se puede variar la composición del aceite extraído.	Alta inversión inicial y extracción de ácidos grasos, pigmentos y ceras se extraen junto al aceite esencial.

Cuadro 1.5 (continuación). Ventajas y desventajas de los principales métodos de extracción de aceites esenciales.

Método de extracción	Ventajas	Desventajas
Destilación por arrastre con vapor	Buenos rendimientos de aceite extraído, obtención de aceite puro, libre de solvente e impurezas, bajo costo y tecnología no sofisticada.	Procesos colaterales como polimerización y resinificación de los terpenos, hidrolisis de esterres y destrucción térmica de componentes.
Extracción con solventes volátiles (éter, pentano, hexano)	Uso de temperaturas bajas por ende no provoca termodestrucción ni alteración química de los componentes del aceite esencial y posibilidad de separación de los componentes individuales.	Costoso contaminante al ambiente, riesgo de incendio y explosión, difícil de separar completamente el solvente sin alterar la composición del aceite y co-extracción de ácidos grasos, ceras, pigmentos y proteínas.

Fuente: (Esquivel & Vargas, 2007).

1.5. Factores que afectan en la extracción del aceite

Tiempo de secado del material: El secado se realiza para disminuir la cantidad de agua en las hojas y de este modo facilitar la extracción del aceite esencial, entre más rápido sea el secado menor probabilidad de contaminaciones pero el tiempo debe ser suficiente para lograr la disminución de humedad requerida. El eucalipto puede durar hasta 4 meses, otras plantas como la albahaca, citronella, menta y limonaria no logran mantenerse mucho tiempo ya que se generan hongos que transfieren un olor terroso mohoso al aceite esencial (Sánchez, 2006).

Tiempo de extracción: pasado un tiempo de extracción ya no se extrae más aceite y el vapor posterior más bien causa el arrastre y emulsión del aceite esencial presentándose una disminución del rendimientos (Sánchez, 2006).

Presión del vapor: Si la presión del vapor de arrastre es muy alta (mayor a 41000 Pa) se presenta hidrólisis en el aceite disminuyendo su calidad y su rendimiento (Sánchez, 2006).

Material del tanque: el tanque de extracción preferiblemente debe de ser en acero inoxidable tipo 304.

Condensación interior. Se evita realizando una purga previa a los 30 minutos de iniciado el proceso y además, manteniendo el tanque bien aislado (Sánchez, 2006).

Factor de empaquetamiento. Si el material queda muy suelto, el proceso termina muy pronto, presentando un alto consumo energético; si queda muy apretado, el vapor se acanala disminuyendo el rendimiento del aceite, que debe de estar entre el 0,15 % a 0,25 % (Sánchez, 2006).

Distribución interior del vapor. Se logra colocando en el fondo del tanque, una flauta de distribución para el vapor (Sánchez, 2006).

Eficiencia del condensador. Pueden presentarse pérdidas si el líquido refrigerante sale tibio (Sánchez, 2006).

1.6. Aplicaciones de los aceites esenciales

Los aceites esenciales no son un bien de consumo directo sino que son materias primas que se dirigen a diferentes ramas de la industria como industria de fragancias, aromas y sabores, medicamentos e industria química y sus derivados. El uso de aceites esenciales como ingredientes fragantes se aprovecha en perfumes, cosméticos (jabones, cremas lociones, desodorantes y champús), productos domésticos de limpieza y aseo (aromatizantes ambientales, limpieza de pisos cocinas), plásticos (enmascaradores de olor), textiles (tratamientos antes y después del teñido), pinturas (solventes biodegradables, enmascaradores de olor) y en papelería (impregnación de fragancias de cuadernos, toallas faciales y sanitarias) (Stashenko, 2009).

Los aceites esenciales se utilizan como ingredientes en aceites para masajes, cremas, lociones, como aromatizantes, productos de aseo personal, desinfectantes, desodorantes,

champús. Además tienen aplicación en la industria tabacalera, textil, pinturas, confitería, salsas, bebidas alcohólicas y gaseosas. En preparados farmacéuticos se emplean como aromatizantes y enmascaradores de olores, fijadores y principios activos. En algunas industrias los aceites esenciales se utilizan como solventes biodegradables, limpiadores y aditivos. En agricultura se utilizan como bioinsecticidas, alelo químicos y bioreguladores (Stashenko, 2009). En el Cuadro 1.6 se detallan los principales sectores y ramas donde se utilizan aceites esenciales como productos funcionales.

Cuadro 1.6. Sectores y ramas donde se utilizan aceites esenciales y productos derivados y los aceites esenciales utilizados.

Sectores	Ramas	Aceites esenciales utilizados
Cosméticos y productos de aseo	Higiene personal, jabones y detergentes, productos de belleza, perfumes y dentífricos.	Cítricos, rosa, eucalipto, menta, lavanda, romero y salvia.
Farmacéuticos	Fito cosméticos, homeopatía, aromaterapia y fito-fármacos.	Cítricos, limonaria, citronela, eucalipto, lavanda, romero, salvia, geranio y menta.
Alimentos	Bebidas gaseosas, dulces, confitería, salsas, enlatados, bebidas alcohólicas, tabaco, aromatizantes y saborizantes.	Cítricos, anís, hinojo, oleorresinas, vainilla, menta, especias.

Fuente: (Stashenko, 2009)

1.6.1. Aceites esenciales en la industria alimentaria

La industria de alimentos incorpora aceites esenciales en diferentes productos como confitería con diferentes sabores, snacks, galletas, lácteos, cárnicos, conservas, condimentos (jengibre, paprika, pimienta) bebidas, licores y estos se utilizan como aromatizantes y para enmascarar sabores amargos (Stashenko, 2009).

1.6.1.1. Uso del aceite esencial como aditivo antibacterial

La actividad antimicrobiana se define como: “La capacidad que posee un fármaco o compuesto natural de inhibir el crecimiento de microorganismos”. Generalmente los compuestos que poseen dicha actividad vienen a tener un gran interés a nivel mundial, ya que con ellos se puede controlar y hasta eliminar las infecciones provocadas por los microorganismos (Estrada, 2010).

El aceite y extracto de distintas plantas han sido utilizados para una diversidad de propósitos por miles de años. Esto se debe a su actividad antimicrobiana, siendo incluidos en procesos de conservación de alimentos, farmacológicos y tratamientos medicinales naturales. Esta propiedad fue estudiada por diversos investigadores, quienes señalan que el aceite esencial de diversas plantas, entre las que se encontraban el romero, poseen actividad antimicrobiana frente a microorganismos Gramnegativos y Grampositivos (Chávez, Escalante, Estrada, & Castañeda, 2008).

Los antimicrobianos naturales son aquellos remedios procedentes del mundo vegetal que son capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos o de eliminarlos. Son aquellos remedios naturales que pueden ser capaces de evitar o curar muchas enfermedades. Los antimicrobianos naturales se diferencian de los sintéticos, es decir aquellos producidos por síntesis en el laboratorio, en las siguientes características: No tienen efectos secundarios: En general, por ejemplo, no producen reacciones alérgicas o sensibilidad en el estómago, son capaces de respetar los microorganismos beneficiosos para el organismo, no resultan peligrosos por acumulación y son baratos y fáciles de conseguir (Estrada, 2010).

El romero contiene más de 40 principios antibacterianos y más de 20 antivíricos. Usado en infusiones puede ayudar a combatir los gérmenes de las enfermedades respiratorias o intestinales. Utilizado como aromatizante en la comida impide al mismo tiempo la proliferación de gérmenes patógenos (Estrada, 2010).

1.6.1.2. Uso del aceite esencial como aditivo anti fúngico e insecticida

Algunos aceites esenciales poseen propiedades antifúngicas y antibacterianas frente a microorganismos patógenos, son tóxicos a nematodos, un amplio espectro de insectos plagas y parecen ser particularmente efectivos contra plagas de productos almacenados.

Además de sus efectos tóxicos agudos, producen numerosos efectos subletales, actúan como inhibidores del crecimiento larval, antialimentarios y repelentes para un amplio rango de insectos y ácaros (García *et al.*, 2006).

Esta característica puede variar considerablemente dependiendo de las condiciones de extracción y de factores ambientales como las condiciones climáticas, localización geográfica y fecha de recolección. A esta variabilidad en la composición química de los aceites esenciales se encuentra asociada a una gran multifuncionalidad como consecuencia de la capacidad de éstos de interactuar con receptores específicos de múltiples dianas biológicas. En este sentido, muchos de los aceites esenciales destacan por ser eficientes insecticidas frente a una amplia gama de insectos (Santana *et al.*, 2012).

1.6.1.3. Uso del aceite esencial como aditivo antioxidante

Los antioxidantes son compuestos de estructura variada, cuya función es servir de sistema de defensa contra los agentes oxidantes, retrasando o previendo procesos de deterioro, daño o destrucción provocados por la oxidación. La acción de los antioxidantes se ejerce sobre las especies químicas agresoras oxidantes, como los radicales libres (hidroxilo, peróxido, superóxido, entre otros), o especies no radicales (oxígeno molecular, el monóxido de carbono entre otras sustancia química deficientes en electrones) (Badui, 1991).

Los antioxidantes, pueden ser de tipo endógeno y exógeno, los primeros, normalmente son enzimas a nivel intracelular relacionadas con la disminución de estos radicales e incluyen la superóxidodismutasa (para eliminar el radical superóxido), así como la catalasa y la glutatión peroxidasa (para la remoción del peróxido de hidrógeno y peróxidos orgánicos). Los sistemas de defensa o antioxidantes de tipo exógeno, normalmente son no enzimáticos y pueden ser tanto naturales (que se pueden encontrar en diversas fuentes alimenticias) como sintéticos (Badui, 1991).

Dentro de los antioxidantes sintéticos, los más comunes son los compuestos fenólicos como el butihidroxiánisol (BHA), el butilhidroxitolueno (BHT), la tert-butilhidroquinona (TBHQ) y los ésteres del ácido gálico como el galato de propilo. Estos antioxidantes, contienen sustituciones alquílicas para mejorar su solubilidad en grasas y aceites. Estos

compuestos, presentan ciertas limitaciones en su uso, por su tendencia a formar otros productos, y por la posible toxicología, la cual ha sido estudiada profundamente, y se ha establecido que su uso prolongado, puede generar inconvenientes a la salud como hiperglicemia, cáncer hepático, alergias y aumento del colesterol; esto ha causado un interés en encontrar antioxidantes naturales efectivos que sustituyan a los artificiales (Sánchez, 2012).

Durante los últimos años, se ha estudiado la influencia que tienen los radicales libres como promotores de un gran número de enfermedades (Young & Woodside, 2001) y del deterioro de los alimentos grasos. La oxidación de los componentes lipídicos de un alimento (regularmente ácidos grasos y triglicéridos) es conocida como rancidez oxidativa o peroxidación lipídica; es una de las reacciones que deterioran y afectan de forma importante la calidad de varios alimentos. La rancidez oxidativa es iniciada por radicales libres del oxígeno o por el ataque del oxígeno molecular a los radicales libres formados en los ácidos grasos poliinsaturados que forman parte de las grasas y aceites (Stashenko *et al.*, 2010).

La peroxidación lipídica iniciada por los radicales libres causa muchos daños a nivel biológico, entre los cuales se destacan la aterosclerosis, enfermedades del hígado, diabetes y envejecimiento. Los peróxidos lipídicos y sus productos secundarios conocidos como “compuestos carbonílicos reactivos”, también causan daños biológicos significativos, entre ellos se destacan los aldehídos como el formaldehído, acetaldehído, malonaldehído (MA) y el 4- hidroxinonal, debido a que son reconocidos como mutagénicos y carcinogénicos (Chaudhary, *et al.*, 1994).

La peroxidación puede ser prevenida o retrasada por los antioxidantes, los cuales son sustancias orgánicas de origen sintético o natural que actúan como atrapadores de los radicales libre del oxígeno involucrado en la oxidación de los ácidos grasos (Percival, 1998). Los antioxidantes sintéticos son los más utilizados; entre ellos, se destacan el hidroxibutilanisol (BHA), que es una mezcla de los isómeros 2-tert-butil-4-hidroxianisol y 3-tert-butil-4-hidroxianisol, el butirato de hidrotolueno (BHT) y la *ter*-butilhidroquinona (TBHQ) (Pokorny, *et al.*, 2001); sin embargo, existe mucha preocupación respecto a sus efectos nocivos para la salud tanto humana como animal, debido a su potencial acción

carcinogénica y a problemas relacionados con toxicidad (Valenzuela & Nieto, 1996). Esta situación ha estimulado la investigación sobre sustancias de origen natural que posean actividad antioxidante potencial (Valenzuela & Nieto, 1996).

Dentro de los antioxidantes de origen natural más estudiados, se encuentran: derivados de ácidos fenólicos, flavonoides, terpenos, tocoferoles, fosfolípidos y ácidos orgánicos polifuncionales (Wanasundara, *et al*, 1994). De igual forma, se ha estudiado la importancia del consumo de frutas y vegetales, y su influencia en la disminución de las enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares y cáncer, debido a que estos productos agrícolas poseen antioxidantes, especialmente vitaminas, como el ácido ascórbico (Vitamina C), α -tocoferol (Vitamina E) y el β -caroteno (Percival, 1998; Valenzuela & Nieto, 1996).

El interés por los antioxidantes naturales también ha llevado a evaluar las propiedades de algunos aceites esenciales (Zygodlo, *et al*, 1995) y extractos vegetales (Atoui, *et al*, 2005). De forma muy general se ha observado en estos materiales que la mayor actividad antioxidante se encuentra en fracciones que contienen tocoferoles, carotenoides y otros compuestos fenólicos diferentes a los tocoferoles (Bruun-Jensen *et al*, 1994).

1.6.1.3.1. Antioxidantes en alimentos

El énfasis en destacar la capacidad antioxidante de los alimentos se sustenta en que el stress oxidativo es un proceso biológico propuesto como un factor etiológico de las enfermedades crónicas no transmisibles y ocurre cuando la velocidad de formación de los radicales libres es superior a la actividad de los sistemas protectores. En condiciones fisiológicas, los compuestos agresores son controlados por la acción integrada y armónica de enzimas generadas por la evolución de miles de años y que depende de nutrientes antioxidantes de los alimentos de origen vegetal, como las vitaminas E y C y compuestos bioactivos antioxidantes llamados fitoquímicos, siendo el grupo más importante el de los polifenoles, que actúan de forma directa e independiente del sistema enzimático. La nutrición juega un rol clave en la mantención del balance adecuado y es necesario considerar prioritariamente la propiedad antioxidante de los alimentos y jerarquizar el valor de los mismos. La biosíntesis de los compuestos bioactivos depende de factores tales como la variedad, el tipo de suelo, la temperatura y el tipo de fertilizante utilizado por lo que es indispensable disponer de datos de los alimentos cultivados en el país (Araya, Clavijo & Herrera, 2006.).

Los polifenoles son efectivos donadores de hidrógeno, particularmente los flavonoides. Su potencial antioxidante es dependiente del número y de la posición de los grupos hidroxilos y su conjugación, así como de la presencia de electrones donadores en el anillo estructural, debido a la capacidad que posee el grupo aromático de soportar el desapareamiento de electrones por desplazamiento del sistema de electrones (Kuskoski, Asuero, Garcia, Troncoso & Fett, 2004).

La oxidación de los productos alimenticios, cosméticos y medicinales, produce un deterioro muy significativo en los mismos, haciendo que pierdan, la mayoría de las veces las propiedades para las cuales fueron elaborados. Las grasas y aceites presentes en estos productos, pueden deteriorarse fácilmente debido a la oxidación, en una serie de reacciones con participación de radicales libres, propagándose y finalmente convirtiéndose en compuestos estables oxigenados, que conllevan a la pérdida de aroma y sabor, junto con otras características indeseables que degradan la calidad del producto (Guala *et al.*, 2009). Debido a la presencia de rosmanol, carnosol y al ácido carnós(ól)ico en el aceite esencial de romero este es un candidato para sustituir a los aditivos antioxidantes sintéticos (BHA y BHT) en los aceites vegetales extraídos para evitar la oxidación lipídica y por lo tanto la pérdida de calidad en estos productos.

1.6.1.2. Uso de antioxidantes para mantener la calidad del aceite comestible

Los antioxidantes sintéticos actualmente se utilizan en la industria de producción de medicamentos, cosméticos, alimentos para animales y materiales para el consumo humano. Los más usados son aquellos que presentan una estructura fenólica en sus moléculas y son utilizados regularmente como aditivos en los alimentos (Badui, 1991).

Existen dos categorías fundamentales de compuestos que se utilizan para evitar el deterioro oxidativo de los lípidos: los donadores de protones y los secuestradores de protones. Entre los primeros están: butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), terbutilhidroxiquinona (TBHQ) y el galato de propilo, estos compuestos no detienen la formación de los radicales libres durante la oxidación, sino que reaccionan con ellos y los atrapa produciendo un nuevo radical en el compuesto antioxidante que es estabilizado por efectos de resonancia, este efecto evita que se presente la etapa de propagación del radical;; bajo estas circunstancias, el antioxidante se consume en la reacción y por lo tanto la

estabilidad del lípido en el tiempo dependerá de la cantidad residual de aditivo que aun contenga (Badui, 1991).

Se conoce que el aceite crudo de soya contiene sus propios antioxidantes (tocoferoles, vitamina E), pero estos no son suficientes para evitar la oxidación natural a la que se ve sometido el aceite. Una alternativa para reducir este problema es la utilización de antioxidantes sintéticos, como el butil hidroxil tolueno (BHT). Este compuesto es liposoluble, por lo que se usa como antioxidante en concentraciones menores a 0,02 % del peso del producto final. Además, es posible combinarlo con otras sustancias, ya que presenta sinergismo en su actividad (Badui, 1991).

El BHT, es un polvo cristalino de color blanco ligero olor fenólico y punto de fusión de 69 °C, insoluble en agua y en propilenglicol pero soluble en etanol, aceites y parafinas; es clasificado como un antioxidante fenólico impedido. Se considera más efectivo cuando es adicionado a las grasas animales que a los aceites vegetales, protege el olor y el aroma de los aceites esenciales y controla la oxidación de las grasas que poseen como componentes mayoritarios los ácidos grasos de cadena corta (Cubero *et al*, 2002).

El BHT es un antioxidante sintético procedente de la industria petroquímica procesado como aditivo alimentario, se utiliza casi siempre mezclado con el BHA, que tiene las mismas aplicaciones; y limitaciones legales. Esta sustancia no es mutagénica pero, como el BHA, es capaz de modificar la acción de ciertos carcinógenos, se elimina en la orina combinado con otras moléculas, provenientes de una vía metabólica común. El BHT suministrado en dosis muy altas, produce lesiones hemorrágicas en ratas y ratones, pero este deterioro no ha sido observado en otras especies animales (Antolovich *et al*, 2000).

El BHA comercial es una mezcla de dos isómeros, el 2-*ter*-butil-4-hidroxianisol y el 3-*ter*-butil-4-hidroxianisol, en la composición predomina el isómero 3-*ter*-butil-4-hidroxianisol llegando a ocupar el 90 %, funde a 48-65 °C, es insoluble en agua, y soluble en propilenglicol, aceites vegetales y parafinicos, el BHA está considerado como un antioxidante fenólico impedido que no presenta problemas de reversión al aumentar la concentración hasta niveles del 0,02 %. Este antioxidante es el más utilizado comercialmente, desde los años cuarenta se utiliza como aditivo alimentario (Kurechi y Kato, 1980), debido a su alta capacidad antioxidante, estabilidad a las variaciones del pH y por su sinergismo con otros antioxidantes como el galato de propilo (Cubero *et al*, 2002)..

El BHA es muy eficaz para contrarrestar la peroxidación de las grasas de fritura, ya que no se descompone o evapora, como lo hacen los galatos o el BHT, además es absorbido por el producto frito protegiéndolo del deterioro oxidativo, en la industria alimenticia se utiliza para proteger las grasas utilizadas en repostería, fabricación de bizcochos, sopas deshidratadas, entre otros; sin embargo, su seguridad ha sido cuestionada extensamente. No tiene acción mutagénica, pero es capaz de modular el efecto de ciertos carcinógenos en animales de experimentación (Cubero *et al*, 2002).

El *tert*-butilhidroquinona (TBHQ), es un polvo cristalino de color blanco, soluble en etanol y éter y poco soluble en agua, es considerado como el mejor antioxidante para aceites de frituras, no es muy eficaz en panificación y horneado, es soluble en grasas y aceites y tiene la ventaja de no formar complejos con el hierro y el cobre, como ocurre con los galatos; por lo tanto no requiere de agentes quelantes para impedir la formación de compuestos coloreados, su utilización no está autorizada en la Unión Europea y está permitida en Estados Unidos y otros países (Cubero *et al*, 2002).

Los galatos están aprobados por la Administración de Medicamentos y Alimentos como aditivo alimentario; por el USDA (Departamento de agricultura de los EE.UU.) y por la Comunidad Europea (EC). Estos derivados naturales, son una alternativa a los antioxidantes sintéticos tradicionales, son empleados como preservantes y antioxidantes con grado alimentario para grasas, aceites y esencias. Puede combinarse con otros productos antioxidantes atóxicos; por ejemplo, con el palmitato de ascorbilo, para conseguir efectos sinérgicos; es común mezclarlo con compuestos quelantes de grado alimentario para inactivar trazas metálicas (hierro y cobre) y evitar la formación de colores no deseados. El galato de propilo es utilizado como antioxidante en los aceites vegetales, productos cárnicos, papas fritas, bases para sopas especialmente de pollo, chicle, entre otros. Los galatos retardan el deterioro de las grasas y aceites se utilizan muy a menudo mezclados con BHA y BHT, debido al efecto sinérgico que tienen entre si estos aditivos. Se recomienda utilizar concentraciones de 0,02 % basado sobre el total de grasa o aceite contenido en el alimento (Cubero *et al*, 2002).

El galato de propilo es el nombre con el cual se conoce al 3, 4, 5-trihidroxi benzoato de *n*-propilo. Este derivado del ácido gálico es obtenido a partir de las vainas del árbol de Tara del Perú (*Caesalpinia Spinosa o Tintorea kuntze*). Comercialmente se encuentra en forma

de polvo cristalino de color blanco o crema, con punto de fusión de 148 °C, inodoro, tiene apariencia áspera y dura al tacto, su gusto es ligeramente amargo y astringente (Cubero *et al.*, 2002). Se encuentra comercialmente como: E-310 galato propilo, E-311 galato de octilo, o E-312 galato dodecilo.

1.6.1.3.3. Mecanismo de autooxidación de aceites y grasas mediante radicales libres

Debido a la sensibilidad que tienen las grasas y los aceites para desarrollar rancidez oxidativa, su utilización en la elaboración de alimentos conlleva un riesgo potencial que está relacionado con su preservación. La rancidez oxidativa es la mayor causa de pérdida de calidad en los aceites durante el almacenamiento, y es favorecida por las temperaturas elevadas y la disponibilidad de oxígeno (Valenzuela & Nieto, 1996).

Los aceites y grasas de fritura con un alto contenido de ácidos grasos insaturados son más susceptibles a la rancidez oxidativa que aquellos con altos niveles de ácidos grasos saturados (Petukhov *et al.*, 1999). La rancidez es definida como la alteración de los aceites y grasas que puede ser detectada organolépticamente”, debido a que ocasiona la aparición de olores y sabores indeseables que deprecian el producto alimenticio y disminuyen su valor nutricional (Barrera & Arellano, 2002).

El deterioro oxidativo, también llamado autooxidación, es el factor más importante que afecta la calidad de los aceites y grasas. El proceso se genera por la reacción del oxígeno atmosférico con los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados. Esta reacción genera los productos primarios de la oxidación (peróxidos e hidroperóxidos), los cuales mediante una serie de reacciones paralelas de ruptura de cadena producen los compuestos secundarios de la reacción que pueden ser volátiles, como aldehídos, cetonas y ácidos, o no volátiles como dímeros, trímeros y polímeros (Barrera & Arellano, 2002). Otros autores señalan que las grasas y aceites se oxidan debido al mecanismo de reacciones en cadena que propician los radicales libres; es decir, en la reacción se generan radicales libres inestables que catalizan la producción de más radicales libres (Adams, 1997; Medina, 1997).

Etapa de inicio o tiempo de inducción. Durante esta etapa se produce la ruptura homolítica del hidrógeno unido al carbono de la posición alfa con respecto al doble enlace, formándose

así los radicales libres inestables R. y H. (Morrison & Boyd, 1990). Esta reacción es acelerada fundamentalmente por la exposición de las materias grasas al oxígeno, calor, luz, humedad y trazas de metales (Fe, Cu, Mg, Ni), y es inhibida por la presencia de antioxidantes (Dustan & Harris, 1994).

Etapa de propagación o periodo de oxidación. Normalmente los radicales libres desaparecerían rápidamente al combinarse, pero en presencia de oxígeno molecular las posibilidades incluyen el choque entre el radical libre R. y el O₂, resultando el radical peróxido ROO. Este radical reacciona luego con una molécula de lípido sin activar (R'H) generándose el hidroperóxido ROOH y el radical libre R., a través del cual se propaga la reacción en cadena (Nawar, 1991).

Etapa de terminación. En esta última etapa los radicales libres que provienen de la descomposición de los hidroperóxidos se asocian para dar compuestos estables. La ruta que siguen los radicales libres y los radicales peróxidos depende de la presencia de catalizadores, radiaciones ionizantes y la temperatura. Los productos finales de reacción incluyen compuestos carbonílicos de cadena corta como aldehídos y cetonas; estos materiales son los responsables del sabor rancio y de las reacciones laterales que conducen a un deterioro generalizado del aceite (Braverman, 1980).

1.6.1.3.4. Índice de peróxidos en aceites

Los productos iniciales en la oxidación (o rancidez oxidativa) de aceites y de grasas son los hidroperóxidos (ROOH), normalmente llamados peróxidos, por lo tanto el índice de peróxidos es usado como una indicación general del nivel de deterioro de los aceites y las grasas, en particular del relacionado con los procesos oxidativos (Badui, 1991).

La determinación de peróxidos se fundamenta en su capacidad de generar yodo a partir de una disolución de yoduro de potasio en ácido acético glacial; el yodo formado se valora con una disolución patrón de tiosulfato de sodio, utilizando una disolución de almidón como indicador. Los resultados del índice de peróxidos se reportan como miliequivalentes de yodo formados a partir de un kilogramo de triacilglicerol muestra, los cuales son equivalentes a los hidroperóxidos presentes en dicho triacilglicerol (Badui, 1991).

1.7. Pruebas de calidad aceites esenciales

1.7.1. Cromatografía de gases

La cromatografía de gases (CG) es una técnica de separación, fundamentada principalmente en fenómenos de repartición del analito entre dos fases; una móvil, constituida por un gas preferiblemente inerte (helio, argón, hidrógeno, nitrógeno); y otra estacionaria, constituida por un sólido o líquido soportado sobre las paredes de la columna. El cromatógrafo consta de un sistema de inyección que permite introducir la muestra en la columna y un sistema de detección de las diferentes sustancias a medida que éstas van saliendo de la columna. La columna se coloca en un horno con temperatura regulable y programable, lo que permite influir de forma decisiva sobre la separación de los componentes de la mezcla (Baharum *et al.*, 2010; Granados *et al.*, 2012; Matiz *et al.*, 2012).

En la cromatografía de gases, la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte, y a diferencia de la mayoría de los tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna. Existen dos tipos de cromatografía de gases: gas - sólido y gas-líquido. La cromatografía gas - líquido tiene gran aplicación en todos los campos de la ciencia. La cromatografía gas - sólido se basa en una fase estacionaria sólida en la cual se produce la retención de los analitos como consecuencia de la adsorción física. La cromatografía gas - sólido ha tenido una aplicación limitada debido a la retención semipermanente de las moléculas activas o polares en la fase estacionaria y a la obtención de picos de elución con colas (una consecuencia del carácter no lineal del proceso de adsorción), de modo que esta técnica no ha encontrado una gran aplicación excepto para la separación de ciertas especies gaseosas de bajo peso molecular. Es por ello que se trata sólo brevemente en la final de este tema (Skoog & West, 2015). La cromatografía gas - líquido se basa en la distribución del analito entre una fase móvil gaseosa y una fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte (RUA, 2009).

Un cromatógrafo de gases comprende cuatro bloques fundamentales, entre los cuales figuran: sistema de aplicación de la muestra (inyector), sistema de separación (columna), sistema de detector de analitos en la muestra (detector) y finalmente el sistema de datos. El

cromatógrafo puede presentar otros dispositivos como detectores convencionales y espectrales, muestreadores de espacio cabeza, pirolizador, equipo de purga y trampas. Algunos terpenos y esteroides pueden isomerizarse o descomponerse al pasar por el inyector que volatiliza la muestra líquida a aproximadamente 250 °C, esto se evita por medio de un inyector tipo *cold on column* (Yagues, 2008). Para el análisis de aceites esenciales se utilizan principalmente detector selectivo de masas y detector de ionización en llama, FID. El FID se utiliza para cuantificar los componentes del aceite (Stashenko, 2009).

Las columnas más utilizadas actualmente son de tipo capilar y están constituidas por un tubo de sílice fundido de 0,25 mm de diámetro y 25 a 60 m de largo; estas columnas proporcionan una alta resolución y permiten separar los componentes de las mezclas que componen el analito por su polaridad y peso molecular. En el análisis de los aceites esenciales son muy utilizadas las que contienen como fase estacionaria polietilenglicol, que es una fase polar; y poli (dimetilsiloxano) que es una fase no polar (Baharum *et al.*, 2010). La parte más importante del sistema cromatográfico es la columna, y su elección está regida por la naturaleza de las muestras que se pretenden analizar. En la elección siempre se debe considerar que la polaridad de la fase estacionaria, el diámetro y la longitud de la columna influyen directamente sobre la eficiencia de la separación y el tiempo requerido para realizar el análisis (Stashenko *et al.*, 2010).

En los análisis de los componentes de un aceites esenciales mediante cromatografía gaseosa se utiliza como parámetro de medición la comparación de los tiempos de retención (t_r) de cada uno de los analitos, o tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la aparición del pico cromatográfico, con los t_r de los compuestos utilizados como patrones o estándares de referencia. Los tiempos de retención dependen de la técnica de inyección, las variaciones de temperatura, el flujo de los gases de arrastre, el tipo de columna seleccionado y el diseño del equipo (Stashenko *et al.*, 2010).

Los índices de retención proporcionan información respecto a la identidad de los componentes, pero ésta no puede basarse exclusivamente en ellos, ya que muchas moléculas poseen índices de retención similares. Por esto es necesario aplicar otra técnica que brinde más información estructural como la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (Stashenko *et al.*, 2010).

En los análisis de los componentes de un aceite esencial mediante cromatografía gaseosa se utiliza como parámetro de medición la comparación de los tiempos de retención (t_r) de cada uno de los analitos, o tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la aparición del pico cromatográfico, con los t_r de los compuestos utilizados como patrones o estándares de referencia. Los tiempos de retención dependen de la técnica de inyección, las variaciones de temperatura, el flujo de los gases de arrastre, el tipo de columna seleccionado y el diseño del equipo (Stashenko *et al.*, 2010).

Los índices de retención proporcionan información respecto a la identidad de los componentes, pero ésta no puede basarse exclusivamente en ellos, ya que muchas moléculas poseen índices de retención similares. Por esto es necesario aplicar otra técnica que brinde más información estructural como la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (Stashenko *et al.*, 2010).

En el Cuadro 1.7 se especifican los detectores de cromatografía de gases mayormente utilizados en el análisis de aceites esenciales.

Cuadro 1.7. Detectores de cromatografía de gases utilizados en el análisis de aceites esenciales y sus aplicaciones.

Detector de cromatografía de gases	Abreviatura	Aplicaciones
Detector de conductividad térmica	TCD	Universal, poco, utilizado por su sensibilidad muy baja.
Detector de ionización de llama	FID	Uno de los detectores más importantes y utilizados en el análisis de aceites esenciales, sobre todo en análisis cuantitativo.
Detector fotométrico de llama	FPD	Utilizado para la detección selectiva de compuestos azufrados en aceites esenciales de grapefruit, ajo cebolla, además se utiliza en la detección de residuos de pesticidas organofosforados.

Cuadro 1.7 (continuación). Detectores de cromatografía de gases utilizados en el análisis de aceites esenciales y sus aplicaciones.

Detector de cromatografía de gases	Abreviatura	Aplicaciones
Detector de captura de electrones	ECD	Altamente sensible y selectivo para compuestos que contienen grupos electronegativos como halógenos, azufrados, nitrogenados, además permite detectar residuos de pesticidas organofosforados.
Detector selectivo de nitrógeno y fósforo	NPD	Utilizado para la detección selectiva de componentes nitrogenados en el aceite esencial, además para el registro de residuos de pesticidas organofosforados.
Detector de espectrometría de masa	MSD o MS	Uno de los detectores espectrales más utilizados para el análisis de aceites esenciales, se obtienen espectros de masas indispensables para la identificación de componentes del aceite.

Fuente: (Stashenko, 2009).

1.7.1.1. Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas

Es una herramienta analítica muy eficiente para el estudio de la composición de los aceites esenciales, y muy adecuada para la identificación de cada uno de sus componentes. La inyección de la muestra puede hacerse directamente al cromatógrafo, sin ningún tratamiento previo, debido a que los componentes de los aceites esenciales son regularmente de bajo peso molecular y relativamente volátiles; este es un aspecto importante ya que se eliminan en gran medida las posibles modificaciones en la composición y/o la estructura de los constituyentes. En el cromatógrafo, los componentes de la muestra se separan y pasan al espectrómetro de masas, permitiendo registrar el espectro de cada una de las sustancias presentes en el aceite esencial. De esta forma los constituyentes de la muestra se pueden identificar mediante los patrones de fragmentación que se observan en sus espectros de masas (Bauer, *et al*, 2001)

1.7.1.1.1. Espectrometría de Masas

La espectrometría de masas comprende el estudio de los fragmentos ionizados (iones-radical), provenientes de la ionización de compuestos puros, generados en la cámara de ionización del equipo de EM. Los iones obtenidos se aceleran mediante campos eléctricos y son enviados hacia el analizador de masas, donde son discriminados de acuerdo a la relación masa/carga (m/z) que cada uno posee y se registran de acuerdo con su abundancia o corriente iónica parcial. Este registro se conoce como espectro de masas y es característico para cada compuesto en particular (Lawrence, 2003). El equipo de masas está conformado por un sistema de alto vacío, una cámara de ionización, un analizador de masas o separador de iones, y un detector acoplado a un sistema de amplificación y registro, las señales se obtienen en forma de una gráfica, denominada (Masada, 1997).

Para la obtención de los iones-radical, se utiliza frecuentemente la ionización electrónica. En esta técnica, se emplea con regularidad un haz de electrones con una energía cercana a 70 eV, producidos por emisión termoiónica desde un filamento de tungsteno. El haz de electrones interactúa con las moléculas que llegan a la cámara de ionización, y la energía transmitida por el haz de electrones produce la ionización y subsiguiente fragmentación de las moléculas de la muestra (Grob, 1995).

La identificación de los componentes del aceite esencial se realiza a través de comparación de los índices de retención de las sustancias patrón, obtenidos en dos fases estacionarias,

polar y apolar, con los índices de Kováts experimentales calculados para los componentes del aceites esenciales (Shibamoto, 1981; Ray, 2002), y mediante los diferentes patrones de fragmentación que se observan en sus espectros de masas (Satinder, 2003; Kitson, *et al*, 1996).

1.7.2. Determinación de propiedades biológicas

Estas son muy importantes para productos que se utilizan para consumo humano (saborizantes y aromatizantes de alimentos), productos de aseo personal como jabones y pastas de dientes, o fármacos. El tipo de propiedad a determinar depende del uso que se dará al aceite por ejemplo las propiedades antioxidante y antimicrobiana son importantes en productos de aseo personal y cosméticos (Stashenko, 2009).

1.7.3. Solubilidad

Los aceites se disuelven bien en solventes orgánicos tales como benceno, pentano, éter de petróleo, *etc.* En cambio, se obtienen grandes diferencias de solubilidad en alcohol al 70 % – 90 % (Bandoni, 2000). Si bien los aceites esenciales son solubles en medio no polar, también suelen tener una solubilidad alta en etanol, lo que es ampliamente explotado en la elaboración de fragancias (Pomilio, *et al*, 1985). La norma internacional que rige esta determinación es la ISO 875:1999.

1.7.4. Otras pruebas de calidad que se realizan a los aceites esenciales son:

1. Evaluación sensorial: La evaluación sensorial se realiza a través de un panel de expertos catadores, y ésta es decisiva a la hora de seleccionar un aceite esencial como ingrediente odorífero, nota fragante en perfumes o desinfectantes (Stashenko, 2009).

2. Determinación de propiedades fisicoquímicas: Para la determinación de propiedades físico químicas se describen los aspectos generales del aceite es decir su textura, color, fluidez y se determinan constantes fisicoquímicas de acuerdo a normas internaciones como por ejemplo se mide densidad, índice de refracción, rotación óptica, acidez, punto de congelación. Estas constantes reflejan propiedades de la mezcla que son debidas a las características del aceite ósea de su composición química. En conjunto, las propiedades físico-químicas y la composición química de un aceite hacen su identificación única, distintiva, que puede servir para la determinación de origen, pureza, precio y aplicabilidad

en alguna de las ramas de la industria alimentaria, farmacéutica, de perfumes, fragancias o productos de aseo personal (Stashenko, 2009).

3. Índice de refracción: El índice de refracción de una sustancia transparente, mide la relación entre la velocidad de la luz en el vacío y la velocidad de la luz en el interior de la sustancia. Se usa para la identificación y determinación de la pureza de un compuesto y para el análisis de la composición de mezclas binarias homogéneas de constituyentes conocidos. Esta propiedad sirve para controlar la pureza y la calidad debido a que cada tipo de aceite esencial posee un índice de refracción característico (Bandoni, 2000) la norma ISO 280:1998 exige su medición.

4. Densidad: La determinación de la densidad permite algunas veces deducir acerca de la composición de los aceites. Los aceites esenciales que tienen densidades mayores de 1,0 g/cm³ contienen principalmente fenoles o sus derivados y ésteres; los de densidad más baja son ricos en hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpénicos (Bandoni, 2000). La densidad se mide de acuerdo con la norma ISO 279:1998.

1.8. Análisis estadístico

1.8.1. Análisis de varianza

Un análisis de varianza (ANOVA) prueba la hipótesis de que las medias de dos o más poblaciones son iguales. Los ANOVA evalúan la importancia de uno o más factores al comparar las medias de la variable de respuesta en los diferentes niveles de los factores. La hipótesis nula establece que todas las medias de la población (medias de los niveles de los factores) son iguales mientras que la hipótesis alternativa establece que al menos una es diferente (Terradez, 2005).

Para ejecutar un ANOVA, debe tener una variable de respuesta continua y al menos un factor categórico con dos o más niveles. Los análisis ANOVA requieren datos de poblaciones que sigan una distribución aproximadamente normal con varianzas iguales entre los niveles de factores. Sin embargo, los procedimientos de ANOVA funcionan bastante bien incluso cuando se viola el supuesto de normalidad, a menos que una o más de las distribuciones sean muy asimétricas o si las varianzas son bastante diferentes. Las transformaciones del conjunto de datos original pueden corregir estas violaciones el valor p

se define como la probabilidad de obtener un valor tan extremo como el que se ha obtenido en la realidad (Terradez, 2005).

Por ejemplo, si se diseña un experimento para evaluar la durabilidad de cuatro productos, se coloca una muestra de cada producto en diez lugares y mide la durabilidad después de 80 días. Debido a que se está examinando un factor (tipo de producto), se utiliza un ANOVA de un solo factor. Si el valor p es menor que el nivel de significancia, entonces se concluye que al menos una media de durabilidad es diferente. Para información más detallada sobre las diferencias entre medias específicas, se utiliza un método de comparaciones múltiples como el de Tukey (Terradez, 2005).

El nombre "análisis de varianza" se basa en el enfoque en el cual el procedimiento utiliza las varianzas para determinar si las medias son diferentes. El procedimiento funciona comparando la varianza entre las medias de los grupos y la varianza dentro de los grupos como una manera de determinar si los grupos son todos parte de una población más grande o poblaciones separadas con características diferentes (Terradez, 2005).

Capítulo 2

Materiales, equipo y metodología

En este capítulo se describe la metodología utilizada para el cumplimiento de los objetivos de este proyecto. Se presentan los materiales, condiciones y equipos requeridos para realizar la extracción del aceite esencial de romero, la determinación del carácter antioxidante y la caracterización del aceite extraído.

La parte experimental se realizó en el laboratorio de química de la escuela de Tecnología de Alimentos de la Universidad de Costa Rica y en el laboratorio de Ingeniería Química también de la Universidad de Costa Rica. El equipo y los reactivos fueron proporcionados por estos laboratorios.

2.1. Materiales

Los materiales para los análisis fueron proporcionados por el laboratorio de la Escuela de Ingeniería Química, mientras que los equipos utilizados para realizar la extracción se obtuvieron del laboratorio de química de la escuela de Tecnología de Alimentos.

El aceite de soya sin antioxidante lo proporcionó la empresa INOLASA SA. El romero se adquirió de un proveedor de Cartago como ramas frescas.

La prueba de caracterización se realizó en el Centro de Investigaciones en Productos Naturales de la Universidad de Costa Rica por medio de un cromatógrafo de gases. La determinación de la capacidad antioxidante se realizó en el laboratorio de Ingeniería Química. En el Cuadro 2.1 se enlistan las características de los reactivos utilizados en los análisis químicos.

Cuadro 2.1. Reactivos utilizados en el desarrollo experimental del proyecto.

Reactivos	Fabricante	Grado	Pureza
Hexano	Arvi Gamma	Técnico	99.6
Etanol	N.R.	Técnico	95
Ácido acético glacial	Merk	Técnico	97
Tiosulfato de sodio	Merk	Reactivo	97
Almidón	Almidonera nacional	reactivo	N.r.
Cloroformo	Labquimar	Técnico	99.8
Dicromato de potasio	Merk	Análisis	99.5
Ácido sulfúrico concentrado	Merk	Análisis	95-97
Yoduro de potasio	Labquimar	Reactivo	99
Bicarbonato de sodio	Quiflo	Técniwo	N.r.

2.2. Equipo

Se armaron los equipos Soxhlet con capacidad para 30g de muestra para la extracción con solventes y las trampas Clavenger para productos de baja densidad para la extracción por arrastre con vapor de agua, el equipo Soxhlet se encuentra en el laboratorio de química de la Universidad de Costa Rica y las trampas Clavenger en el laboratorio de Química del Centro de Investigación en Tecnología de Alimentos, estos equipos se detallan en la metodología experimental.

En el Cuadro 2.2 se presentan las especificaciones de los equipos utilizados durante el desarrollo experimental. Además se utilizó la siguiente cristalería: balones aforados, matraces erlenmeyers, beakers, probetas, vidrios de reloj, pipetas, agitadores de vidrios, buretas, termómetros, embudos de espiga larga, embudos de espiga corta, goteros, espátulas, viales y condensadores. En el Cuadro 2.2 se enlista el equipo utilizado en los análisis de la tesis.

Cuadro 2.2. Equipos utilizados en el desarrollo experimental del proyecto.

Equipo	Fabricante	Modelo	Número de placa
Balanza analítica	Ohaus		279853
		Adventurer	
Balanza semianalítica	Adam	-	223342
Cromatógrafo de gases	Shimadzu	GC-17A	321779
Licuada	Oster	-	
Secador	TAISA	OV-12	330582
Estufa al vacío	Cole Parmer	60648	141856
Plantilla de calentamiento	Corning	-	196077
Bomba de vacío	Buchi	V700	-
Equipo de extracción	Lab line instruments	-	67394
Controlador de temperatura	Polyscience	-	330581
Destilador	Buchi	B480	173442
Equipo Soxhlet	Glassco	-	-
Trampas Clavenger	Glassco	-	-

2.3 Metodología experimental

2.3.1 Análisis preliminar de las condiciones de operación

Para iniciar con el desarrollo experimental del proyecto se realizó un estudio preliminar de las condiciones con mayor efecto en el proceso de extracción de aceites esenciales con el fin de establecer los requerimientos de los equipos y la escala de estos.

Los principales factores que intervienen en la extracción de aceites esenciales son el método utilizado, solvente, composición de la materia prima y especie. En los siguientes puntos de análisis se determinan los intervalos de operación y la justificación para la escogencia de las variables de diseño a desarrollar.

- Método utilizado para el proceso de extracción de aceites esenciales

En cuanto al método utilizado según Peredo *et al.* (2009), el método de arrastre por vapor es un método muy sencillo y de bajo costo, en este método es posible utilizar un gas inerte pero se tendrán problemas de condensación y recuperación del destilado o del gas, por lo que es mejor utilizar el vapor de agua. La temperatura a lo largo de la columna permanecerá constante a lo largo de la destilación ya que no existen cambios en la presión de vapor o en la composición de los vapores de la muestra en otras palabras el punto de ebullición permanecerá constante mientras ambos líquidos estén presentes en la fase líquida y en el momento que uno de los líquidos se elimine de la mezcla en ebullición este punto se elevará bruscamente. En cuanto al método de extracción por solventes Peredo *et al.* (2009), la muestra a extraer se pone en contacto con solventes orgánicos y se realiza la destilación este método aunque es sencillo presenta inconvenientes de que pueden quedar residuos y que es peligroso, por ende se utilizaron solventes de grado alimentario para minimizar dicho peligro.

- Tiempo de extracción para el proceso

Respecto a la variable tiempo, se determina mediante el método estipulado para la extracción con Soxhlet y extracción por arrastre con vapor con trampas Clavenger. Para Soxhlet, el método oficial estipula un total de 21 sifonazos como mínimo u ocho horas de extracción. En el caso de la extracción por arrastre por vapor, el método oficial recomienda dos horas y treinta minutos a partir de que comienza a destilar en el balón de fondo plano.

- Especie a extraer

Según Stashenko (2009) el rendimiento de aceites esenciales varía entre un 0,1 % y 2 % porcentaje masa-masa. En el caso del aceite esencial de romero este porcentaje es de aproximadamente un 1,7 %, el cual se encuentra cercano al límite superior del rango encontrado en la literatura.

1.3.2. Pretratamiento de los ramos frescos de romero

En la extracción de aceites esenciales uno de los principales problemas es el elevado contenido de humedad de las hojas, que evita la salida del aceite esencial y por ende disminuye el rendimiento. La forma de eliminar este problema es secando las ramas frescas a aproximadamente 40° C durante tres días. En la Figura 2.1 se muestra la apariencia de las ramas frescas luego de realizar este pretratamiento anteriormente mencionado.



Figura 2.1. Apariencia de los ramos de romero luego del secado a 40 °C.

Este pretratamiento a las hojas de romero se realizó un secador de aire caliente por resistencia durante dos días a 40 °C para evitar la degradación y pérdida de compuestos volátiles por altas temperaturas, posteriormente se separaron las hojas de las ramas, debido a que las ramas no contienen aceite esencial, las hojas se molieron por medio de una licuadora y se colocó en los balones o el equipo Soxhlet según fuera el caso la muestra anteriormente pesada. En la Figura 2.2 se muestra el secador utilizado para esta parte del experimento.



Figura 2.2. Secador utilizado para secar las ramas frescas de romero.

2.3.3. Primera etapa experimental

Se plantea una primera etapa experimental en la cual se varía la cantidad de solvente a agregar en el pretratamiento del material para determinar con qué niveles de esta variable trabajar, y una segunda etapa experimental donde se varía el tiempo de pretratamiento para la extracción para evaluar los tiempos de extracción mencionados anteriormente. En la Figura 2.1 se observa el secador al vacío utilizado para disminuir la humedad de las hojas de romero utilizadas en la extracción.

2.3.4. Determinación de las condiciones de operación

Para desarrollar la extracción del aceite esencial se realiza un estudio de los principales factores en este proceso, específicamente tipo de solvente, tiempo de extracción y materia prima, con lo cual se determinan las condiciones de operación requeridas para realizar la extracción de este aceite esencial.

Respecto al tiempo de extracción, se determina por medio de la literatura consultada, la cual recomienda dos horas para el método de arrastre por vapor y 8 horas para el

método Soxhlet (Castañeda *et al.*, 2007; Zygadlo, *et al.*, 1995). La materia prima se obtiene con el mismo proveedor para todas las corridas y repeticiones.

Se realiza un análisis de varianza para el estudio del efecto del disolvente arrastre por vapor, etanol y hexano en la extracción del aceite esencial de romero.

Como variable de respuesta ante este factor se utiliza el porcentaje de extracción de masa inicial de romero molido y el producto destilado.

$$\%Extracción = \frac{m_{inicial} - m_{producto}}{m_{inicial}} \times 100$$

Como variables fijas controlables se mantiene la temperatura de ebullición de cada solvente durante la extracción, el romero utilizado y tiempo de destilación.

Como variables fijas no controlables se presentan la temperatura y presión ambiente.

2.3.5. Instalación y puesta en marcha del equipo de extracción con solventes.

Para la extracción del aceite esencial de romero con el método Soxhlet (disolventes etanol y hexano) se fijaron las condiciones mostradas en el Cuadro 2.3.

Cuadro 2.3. Condiciones de operación para extracción de aceite esencial de romero con el método Soxhlet.

Condición	Magnitud
Disolvente	250 mL
Tiempo	8 h
Hojas secas romero	45 g
Agitación	200 rpm
Temperatura	Ebullición disolventes
Temperatura del agua de enfriamiento	20 °C

La masa de hojas secas se determinó por la capacidad del equipo Soxhlet y el volumen de disolvente fue determinado por lo balones utilizados y por la capacidad del equipo Soxhlet,

la agitación fue establecida en la plantilla y debido a motivos técnicos se debe mantener a un nivel de operación medio- bajo para evitar el daño a los balones utilizados y el tiempo de extracción se definió por medio de la literatura que establece 20 caídas de cabeza del sifón Soxhlet. La temperatura se estableció como la temperatura de ebullición de cada disolvente que para el etanol fue de 78 °C y para el hexano de 66 °C, aproximadamente. La temperatura del agua de enfriamiento en el condensador fue de 20 °C.

Este equipo consiste en un Soxhlet, un balón, un calentador para equipos Soxhlet y un condensador. A continuación se presenta el equipo en operación en la Figura 2.3.



Figura 2.3. Equipo utilizado en operación para llevar a cabo la extracción de aceite esencial por medio de equipo Soxhlet.

Posteriormente a la extracción se realiza la destilación de la muestra en equipo Soxhlet con los solventes en balones de fondo plano de 250 mL a 75 °C en el caso del etanol y a 65 °C en el caso del hexano, se deja 25 sifonazos (9 horas aproximadamente donde la cámara del equipo Soxhlet se llena de solvente condensado y baja al balón con el extracto). En la Figura 2.5 se observa el calentador Soxhlet utilizado para realizar la extracción con solventes de aceite esencial de romero.



Figura 2.4. Calentador para extractor Soxhlet con solventes.

Para la purificación del aceite esencial obtenido por el método Soxhlet (extracción con solventes) se procede a destilar el disolvente en un destilador al vacío marca Buchi por 10 minutos, de modo que no haya una ebullición violenta del extracto en el equipo se regula la temperatura del líquido de condensación y las temperaturas de ebullición de los solventes. Las muestras se cuantifican y se determina el porcentaje de rendimiento por diferencia de masas.

A continuación, en la Figura 2,5, se presenta el equipo de destilación en operación.



Figura 2.5. Equipo de destilación (rotavapor) en operación.

2.3.6. Instalación y puesta en marcha del equipo de extracción con arrastre por vapor.

Se realiza la extracción de la muestra en balones de 2 L con la muestra, agua y trampas de Clavenger acopladas, se destila por 3 horas, donde el agua por tener alta densidad sale por la parte de abajo del destilado en la bureta y cae al balón y el aceite esencial queda en la parte de arriba de la trampa, se cuantifica por medio de una bureta pequeña donde se lee en la interfase la cantidad de aceite esencial de romero. El destilado se separó tomando en cuenta sus propiedades de inmiscibilidad y diferencia de densidades entre el agua y el aceite esencial, utilizando una pera de separación de vidrio. Se deshidrató las impurezas de agua en el aceite esencial con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se guardó en un frasco de vidrio bajo refrigeración, a una temperatura de 4 °C, hasta su posterior uso.

Para la extracción del aceite esencial de romero con el método de arrastre con vapor de agua se fijaron las condiciones mostradas en el Cuadro 2.4.

Cuadro 2.4. Condiciones de operación para extracción de aceite esencial de romero con el método arrastre con vapor.

Condición	Magnitud
Agua	500 mL
Tiempo	2,5 h
Hojas secas romero	125 g
Agitación	450 rpm
Temperatura	97 °C
Temperatura del agua de enfriamiento	19 °C

La masa de hojas secas utilizadas en la extracción con arrastre por vapor se determinó por la capacidad del balón utilizado que fue de 2 L y el volumen de disolvente igualmente fue determinado por el volumen de dichos balones y por la capacidad de las trampas Clavenger, la agitación fue establecida en la plantilla y debido a motivos técnicos se debe mantener a un nivel de operación medio alto debido a que se debe agitar un mayor volumen de líquido y el tiempo de extracción se definió por medio de la literatura que establece que el tiempo de extracción debe ser de mínimo 2,5 h. La temperatura se estableció como la temperatura de ebullición del agua que fue de 97 °C.

Este equipo consiste en una trampa Clavenger, un balón, un calentador y un condensador. A continuación se presenta el equipo en operación en la Figura 2.6.



Figura 2.6. Equipo utilizado en operación para llevar a cabo la extracción de aceite esencial por medio arrastre con vapor.

2.3.7. Determinación de propiedad antioxidante del aceite esencial de romero

Para la determinación de la propiedad antioxidante del aceite esencial de romero extraído se fijaron las condiciones mostradas en el Cuadro 2.5.

Cuadro 2.5. Condiciones de operación para la determinación de la propiedad antioxidante del aceite esencial de romero extraído.

Condición	Magnitud
Temperatura de calentamiento del aceite de soya	180 °C
Tiempo de calentamiento	5 min
Materia prima	Aceite de soya sin antioxidante añadido
Tiempo del análisis total	15 días

La temperatura de calentamiento del aceite de soya para la determinación se fijó como el máximo alcanzado por la freidora utilizada que fue de 180 °C la cual es una temperatura comúnmente utilizada en la cocción y fritura de alimentos. En cuanto a la materia prima se eligió aceite de soya por ser un aceite producido a nivel nacional por la empresa Inolasa y por ser un aceite sumamente insaturado y por ende ser muy vulnerable a la oxidación lipídica de sus triacilgliceroles (Badui,1991).

El procedimiento realizado fue el siguiente: se determinó el índice de peróxidos de tres muestras de aceite de soya calentado por duplicado a 180 °C durante 5 min, se almacenó y se repitió el procedimiento en diferentes días a lo largo de dos semanas para evaluar la oxidación. Las muestras eran aceite sin antioxidante, con antioxidante artificial (BHT) y con aceite esencial (extraído por el método con arrastre con vapor). La variable experimental es el antioxidante utilizado y la variable respuesta el índice de peróxidos, el cual consiste en una valoración con una solución patrón de tiosulfato de sodio pentahidratado y disolución de almidón como indicador. En la Figura 2.8 se ilustra el freidor utilizado para oxidar el aceite por calentamiento a 180 °C.



Figura 2.7. Freidor utilizado para calentar el aceite hasta 180 °C.

2.3.8. Caracterización del aceite esencial de romero obtenido.

El aceite esencial de romero obtenido por el método de arrastre con vapor es caracterizado por cromatografía de gases con nitrógeno y helio como gases de arrastre y detector tipo espectrofotómetro de masas en el Centro de Investigaciones en Productos Naturales de la Universidad de Costa Rica. Este análisis dura un tiempo aproximado de 75 min y el equipo compara los tiempos de retención de los componentes del aceite esencial contra una base de datos que contiene el analizador de datos del equipo por medio de un detector espectrofotómetro de masas.

2.3.9. Diseño estadístico

2.3.9.1. Extracción del aceite esencial

Como análisis estadístico se utilizó un análisis de varianza de un factor (ANOVA), el factor fue el método de extracción y los tres tratamientos fueron extracción con equipo

Soxhlet (disolvente hexano), extracción con equipo Soxhlet (disolvente etanol) y método de arrastre con vapor de agua.

2.3.9.2. Prueba antioxidante

Como análisis estadístico se utilizó un análisis de varianza de dos factores para el índice de peróxidos determinado del aceite de soya, donde los factores fueron tiempo y tratamiento antioxidante, y donde se evaluaron con tres tratamientos (muestra si antioxidante, muestra con BHT y muestra con aceite).

Capítulo 3

Análisis de resultados

3.1. Determinación del rendimiento del aceite esencial

En el Cuadro 3.1 se muestran los porcentajes de rendimiento de extracción obtenidos por triplicado por método de arrastre con vapor y método de extracción con solventes con hexano y etanol, los tres por triplicado.

Cuadro 3.1. Porcentaje de rendimiento de extracción de aceite esencial de romero por medio de tres métodos.

Réplica	Extracción Soxhlet con etanol (% m/m)	Extracción Soxhlet con hexano(% m/m)	Extracción por arrastre con vapor (% m/m)
1	40,7	12,8	2,4
2	24,6	31,2	2,5
3	26,7	19,5	2,4

La medición del rendimiento de extracción se hizo por triplicado. Estas repeticiones se realizaron el mismo día para asegurarse que las condiciones del experimento como presión y temperatura ambiental fueran las mismas ya que estas afectan en el tiempo de calentamiento inicial del equipo y en las condiciones de ebullición de los solventes utilizados. En el cuadro 3.1, se aprecia que para los métodos con solventes hay grandes variaciones entre algunas repeticiones del mismo tratamiento esto se debe principalmente a las posibles pérdidas de material durante la extracción y la destilación del solvente y la homogeneidad del romero utilizado. Esto se puede comprobar posteriormente en el análisis estadístico de los datos.

Según la literatura el rendimiento de aceites esenciales varían del 0,5 % al 2 % por lo tanto los rendimientos obtenidos con solventes se encuentran muy por encima del límite superior

esperado (Pérez, 2006). Un estudio realizado indica que con extracción con solvente se obtuvo un rendimiento promedio de 15,5 % y con destilación por arrastre con vapor se obtuvo un rendimiento promedio de 1,3 % (Martinello *et al*, 2005). Así mismo en un estudio realizado extrayendo aceite esencial de romero por medio del método de hidrodestilación con hojas frescas se obtuvo un rendimiento de 1,35 % Con base en esto se observa que los valores obtenidos de rendimiento son mayores a los valores determinados en los estudios.

Para determinar si la variación en el método de extracción es significativa, se deberá recurrir a un estudio estadístico, precisamente un Análisis de varianza (ANOVA por sus siglas en ingles) de un factor. En cuyo caso la variable de respuesta está representada por el porcentaje de rendimiento. A partir de este estudio se podrá determinar si la variación es consecuencia del error asociado a la medición, o por el contrario, existe una variación significativa en el método y no es repetible de modo que se puede concluir si el método utilizado influye en el rendimiento de extracción del aceite esencial de romero.

3.2. Comprobación del método análisis de varianza para porcentaje de rendimiento

Para comprobar que el método es preliminarmente reproducible y por lo tanto es confiable con 2 grados de libertad se realiza el análisis estadístico. Se realiza este análisis para el porcentaje de rendimiento de aceite esencial para esto se requiere el cálculo del promedio la varianza y la desviación estándar para cada tratamiento utilizado para extraer. En el Cuadro 3.2 se muestra el cálculo de los estadísticos para cada tratamiento.

Cuadro 3.2. Estadísticos calculados para el porcentaje de rendimiento para cada uno de los métodos de extracción de aceite esencia utilizado.

Método de extracción	Promedio	Desviación estándar	Varianza
Extracción Soxhlet con etanol	30,7	8,8	76,6

Cuadro 3.2 (continuación). Estadísticos calculados para el porcentaje de rendimiento para cada uno de los métodos de extracción de aceite esencia utilizado.

Método de extracción	Promedio	Desviación estándar	Varianza
Extracción por arrastre con vapor	2,4	0,06	0,003
Extracción Soxhlet con hexano	21,2	9,3	86,7

A partir de esta tabla se observa que las varianzas y por ende la desviación estándar de los porcentajes de rendimiento son diferentes para los tres tratamientos siendo mayores para las extracciones con Soxhlet (hexano y etanol) que para la extracción por arrastre con vapor lo que significa que la variabilidad de las extracciones con Soxhlet son mayores a la variabilidad de las extracciones con arrastre por vapor, esto podría ser debido a que en el Soxhlet el material está en contacto directo con el solvente no así en el caso del equipo por arrastre con vapor, además al utilizar el equipo Soxhlet se debe realizar una destilación final del solvente que con el equipo por arrastre no se debe efectuar. Sin embargo es necesario realizar una prueba estadística en este caso un ANOVA de un factor, para demostrar si existe diferencia estadística significativa entre los métodos analizados. Por lo tanto se realiza el ANOVA en el programa JMP para determinar si hay diferencia significativa entre los promedios para los tres tratamientos propuestos donde el planteamiento de la hipótesis nula se describe con la ecuación 3.1.

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 \text{ si } p > \alpha = 0,05 \quad (3.1)$$

Y la correspondiente hipótesis alternativa se muestra en la ecuación 3.2.

$$H_0: \mu_i \neq \mu_j \text{ si } p < \alpha = 0,05 \quad (3.2)$$

Luego de introducir los datos al programa JMP, los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 3.3.

Cuadro 3.3. Análisis de varianza de un factor realizado para el porcentaje de rendimiento de aceite esencial con un 95 % de confianza ($\alpha=0,05$).

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Probabilidad
Factor	2	1238,31	619,15	0,0091
Error	6	326,66	54,44	
Total	8	1564,97		

Como se observa en el Cuadro 3.3, se observó que la probabilidad tiene un valor de 0,0091 y la significancia $\alpha= 0,05$ por lo tanto con un 95 % de confianza se puede decir que cabe dentro de la zona de rechazo de la hipótesis nula, esta zona se encuentra en valores menores al valor de la significancia asignado ($\alpha=0,05$) para un 95 % de confianza.

Además se realiza una prueba de Tukey para todos los pares de tratamientos la cual se muestra en el Cuadro 3.4.

Cuadro 3.4. Análisis de medias para el porcentaje de rendimiento de aceite esencial con un 95 % de confianza ($\alpha=0,05$).

Método de extracción	Numero de réplicas	Promedio	Agrupación prueba de Tukey
Extracción Soxhlet con hexano	2	30,7	A
Extracción Soxhlet con hexano	3	21,2	A
Extracción por arrastre con vapor	3	2,4	B

Esta prueba se realiza para un 95 % de confianza y se evalúa específicamente el promedio de los métodos utilizados y se le asigna una letra a cada valor obtenido. En este caso para ambas extracciones Soxhlet con disolventes (etanol y hexano) se les asigna una misma letra (A) lo cual quiere decir que sus promedios están cercanos entre sí y por lo tanto con la

prueba de Tukey se concluye que las medias obtenidas no son significativamente diferentes para la extracción Soxhlet con hexano y para la extracción Soxhlet con etanol.

Se presenta la gráfica de los intervalos de confianza para el porcentaje de rendimiento en la Figura 3.1. Para comprobar la validez de esta prueba, los residuos deben describir un comportamiento normal.

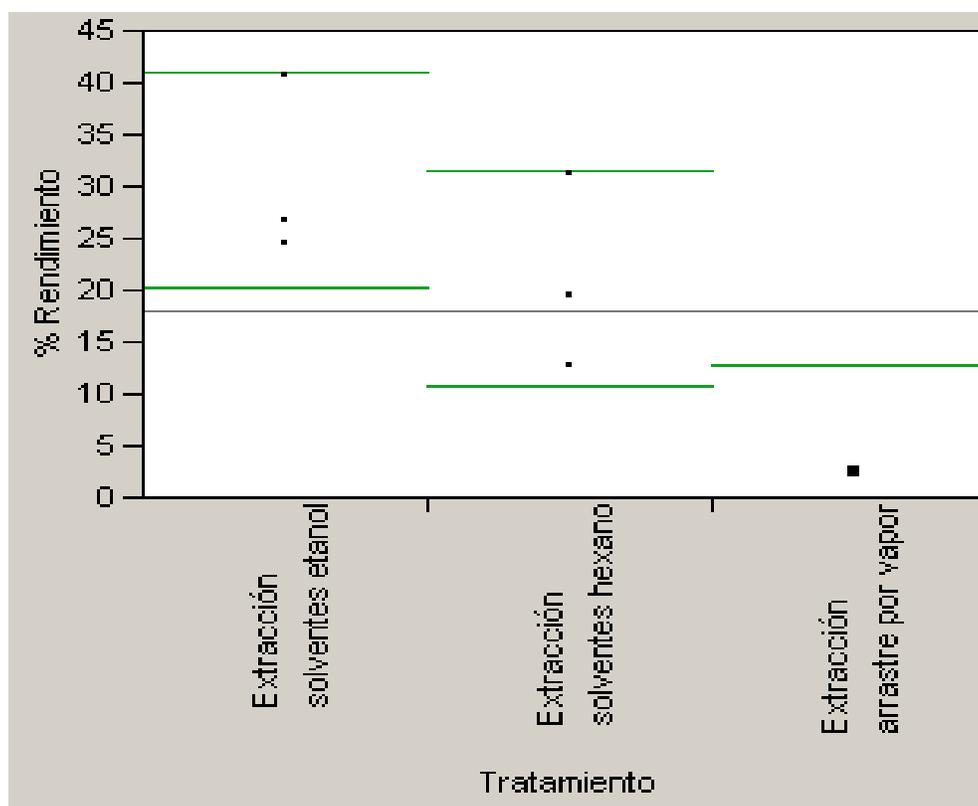


Figura 3.1. Gráfica de intervalos de confianza para el análisis de varianza de un factor para el rendimiento del aceite esencial de romero por los métodos de extracción utilizados.

Se observa que los intervalos de confianza, los cuales son calculados a partir de la desviación estándar agrupada, se extienden de tal forma que las medias de los tres métodos de extracción utilizados se encuentran dentro los límites de confianza establecidos, esta conclusión reafirma la evidencia estadística que arrojó la prueba de Tukey. Por lo tanto es posible afirmar que con un 95 % de confianza, hay evidencia estadística para rechazar la hipótesis de igualdad de medias para el porcentaje de extracción del aceite esencial de romero extraído y por consecuencia aceptar la hipótesis de desigualdad de medias que dice

que el método de extracción por arrastre con vapor da porcentaje de rendimientos menores a los obtenidos por extracción con solventes (hexano y etanol). Además se obtiene que ambas extracciones con Soxhlet se traslapan en gran parte de su intervalo por lo tanto se puede concluir con más seguridad que ambos métodos son estadísticamente iguales.

Para considerar válidos un análisis de varianza se debe examinar los residuos para comprobar la normalidad de la prueba. Debido a que una de las condiciones a cumplirse es que los datos obtenidos muestren una distribución normal para realizar este análisis se grafican los residuos en tres gráficas (probabilidad normal, ajustes e histograma). en la Figura 3.2, se muestra la gráfica de probabilidad normal.

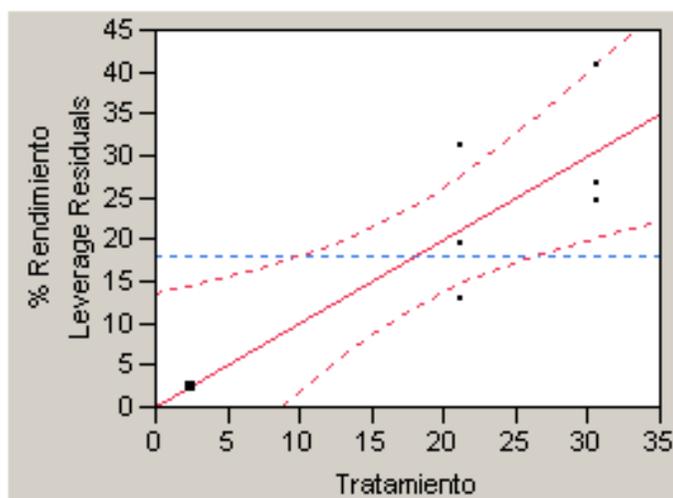


Figura 3.2. Gráfica de probabilidad normal para los residuos del análisis de varianza de un factor para el rendimiento del aceite esencial de romero por los métodos de extracción utilizados.

La gráfica de probabilidad normal presenta los residuos distribuidos alrededor de la línea de distribución normal, sin embargo como se observa hay tres residuos alineados verticalmente, este comportamiento mostrado no es el esperado debido a que se desea que los puntos se distribuyan siguiendo un comportamiento a lo largo de la línea de normalidad. Por lo tanto la gráfica no arroja evidencia suficiente para comprobar la normalidad de los residuos y por consiguiente se busca respaldar el análisis de normalidad con otras gráficas.

En la Figura 3.3 se muestra la gráfica de los residuos.

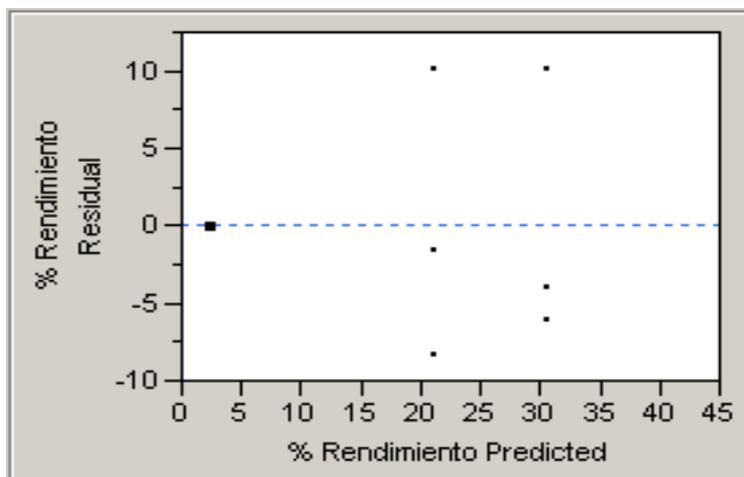


Figura 3.3. Gráfica de ajustes para residuos del análisis de varianza de un factor para el rendimiento del aceite esencial de romero por los métodos de extracción utilizados.

La gráfica de residuos contra los valores ajustados arroja una distribución de puntos no simétrica a ambos lados de la recta lo cual es un posible indicador de una distribución normal de los datos. Además se observa que la gráfica no muestra una tendencia clara por lo cual se puede decir que existe un criterio para afirmar que los residuos tienen un comportamiento de distribución normal.

A continuación se muestra el histograma de los residuos en la Figura 3.4.

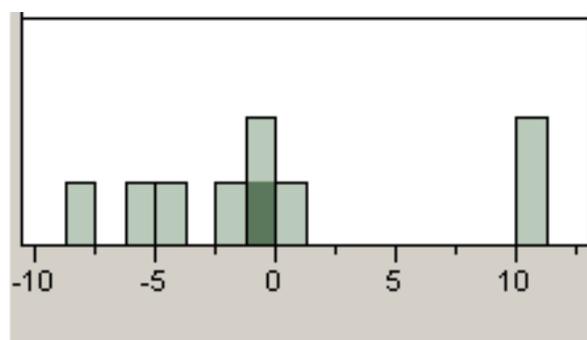


Figura 3.4. Histograma de los residuos para análisis de varianza de un factor para el rendimiento del aceite esencial de romero por los métodos de extracción utilizados.

El último gráfico que se debe analizar es el histograma de los residuos, en el gráfico mencionado se puede observar una ligera tendencia a una distribución normal pues se observa un valor alto cerca del centro y valores bajos en los extremos, este comportamiento es esperado en residuos que cumplen con el criterio de normalidad.

A pesar de que se obtiene una evidencia no conclusiva en el gráfico de probabilidad normal para los residuos, al tomarse en cuenta los dos siguientes, se puede tomar la decisión de aceptar una normalidad de los datos, por lo tanto es posible concluir que los residuos presentan una distribución normal para la determinación del porcentaje de extracción de aceite esencial de romero.

A pesar de que se obtiene en el análisis estadístico que el porcentaje de rendimiento de la extracción con solventes (hexano y etanol) es significativamente mayor al porcentaje de extracción obtenido por el método de arrastre con vapor con un 95 % de confianza, se deben tomar en cuenta otros factores como la pureza del aceite esencial obtenido. En el Cuadro 3,5 se muestran los aspectos a evaluar en la toma de decisión del aceite esencial a utilizar en la prueba de la capacidad antioxidante del aceite esencial de romer.

Cuadro 3.5. Características sensoriales y de proceso de los aceites esenciales obtenidos por los metodos evaluados para la toma de decisión.

Parámetro	Extracción Soxhlet con etanol	Extracción Soxhlet con hexano	Extracción por arrastre con vapor
Color	Verde oscuro	Amarillo oscuro	Incoloro
Consistencia	Gelatinosa casi sólida	Pegajosa	Líquida
Aroma	Aceite esencial de romero	Aceite esencial de romero	Aceite esencial de romero
Viscosidad	Alta	Baja	Baja
Tiempo de proceso (h)	8	8	2,5
Pureza	Baja	Baja	Alta

Experimentalmente al extraer el aceite esencial con etanol y con hexano se obtiene un aceite esencial no acorde con las características esperadas como se observa en el Cuadro 3.5. El aceite esencial extraído con etanol presenta una consistencia gelatinosa y viscosa debido posiblemente a la extracción tanto de los volátiles como de otros componentes de la planta como gomas, mucilagos, proteínas, celulosa, proteínas y ceras polares, ya que el etanol es un solvente sumamente polar que va a solubilizar compuestos polares mayoritariamente como los mencionados anteriormente. En cuanto el aceite esencial extraído con hexano presentó una coloración amarilla intensa y al tacto presentaba una consistencia pegajosa debido probablemente a la extracción de polifenoles de alto peso molecular, tocoferoles, gomas y ceras, al ser este solvente sumamente no polar. En la Figura 3.5.b se muestra el aceite esencial obtenido por medio de extracción Soxhlet con hexano como disolvente posterior a la destilación el cual presenta una coloración oscura amarillenta debido a la presencia de tocoferoles y polifenoles.

Esto es debido a que el producto está en contacto directo con el solvente y este baja al balón extrayendo no solo los compuestos volátiles sino también los compuestos anteriormente mencionados, estos al realizar la destilación quedan en el balón y por ende son pesados obteniéndose rendimientos altos. Contrariamente durante la extracción por arrastre con vapor, el agua se calienta y el vapor producido pasa por el material extrayéndose solamente los compuestos volátiles que conforman el aceite esencial, sin otros componentes no volátiles, estos son condensados y se separan por la insolubilidad que presentan los aceites esenciales al agua. Se obtiene un aceite esencial sumamente claro y aromático que se evaporaba completamente al contacto con las manos sin dejar residuos, contrario al aceite esencial obtenido con la extracción Soxhlet los cuales eran oscuros y viscosos. Por esta razón el rendimiento para el aceite esencial de romero extraído por arrastre con vapor es mucho menor al obtenido por los otros dos métodos pero se obtiene un aceite esencial de mejor calidad y por consiguiente con este se realiza el análisis de la propiedad antioxidante por ser apto para un producto alimentario como lo es el aceite de soya.

Es importante mencionar además que el aceite esencial extraído por etanol presentó una coloración verde oscura debido a la extracción de clorofila de las hojas que aunque estaban secas aun presentaban este pigmento en su estructura. Al ser una molécula relativamente

polar y orgánica es muy soluble en alcoholes por lo tanto no es de extrañar que se haya obtenido un aceite esencial verde. Además según la literatura la clorofila es un compuesto sumamente pro oxidante por ende no es conveniente agregarlo a alimentos muy susceptibles a la oxidación como los son los aceites de cocina (Badui, 1991). En la Figura 3.5.a, se muestra el aceite esencial obtenido por extracción Soxhlet con etanol posterior a la destilación el cual muestra una coloración verdosa y una consistencia pastosa.

Al obtenerse extractos no puros con ambos métodos de extracción con solventes evaluados y obtenerse un aceite esencial con características de color y textura adecuadas para un producto como el aceite de cocina con el método por arrastre con vapor (Figura 3.5.c), se procede a utilizar este en las pruebas antioxidantes, pues es el que reúne las características sensoriales necesarias. Además este aceite esencial es el menos costoso, pues no lleva un proceso de refinación para purificarlo y utilizarse de este modo en aceites, siendo el más adecuado para su uso en este tipo de producto, aun cuando fue el de menor porcentaje de rendimiento según el análisis estadístico realizado. Sin embargo, los aceites esenciales extraídos por solventes podrían utilizarse en otros productos donde no sea necesario un extracto tan puro, como embutidos, no sin antes realizar las pruebas adecuadas.

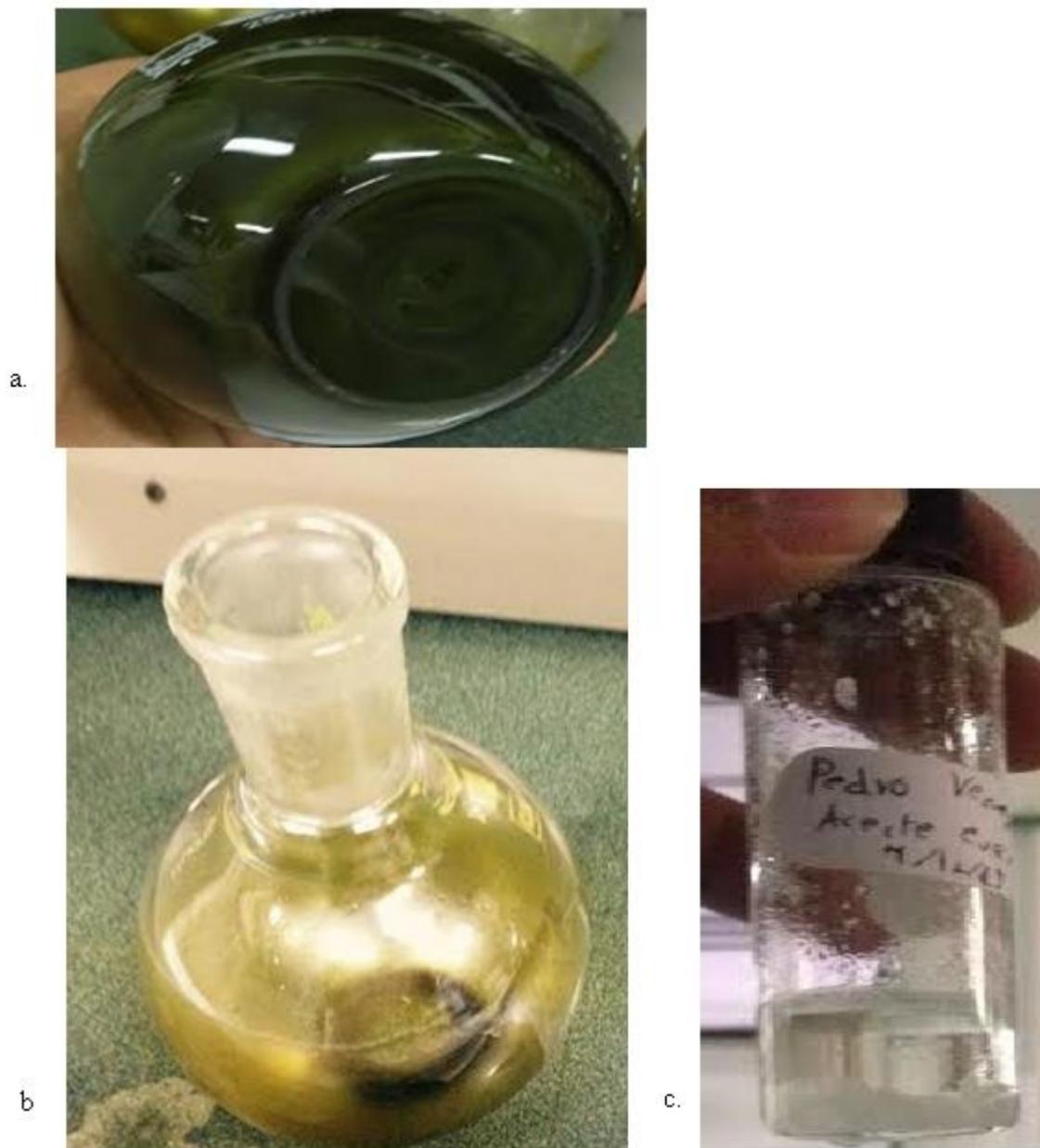


Figura 3.5. Aceite esencial extraído por diferentes métodos. Método. a. Soxhlet con etanol
b. Soxhlet con hexano. c. Arrastre con vapor.

3.3. Determinación de la capacidad antioxidante del aceite esencial de romero

Como se observa en la Figura 3.6 al pasar el tiempo se aumenta el índice de peróxidos para los tres tratamientos analizados (sin antioxidante, con antioxidante artificial y con aceite esencial extraído por arrastre con vapor, esto concuerda con la teoría ya que al estar el contacto el aceite con el oxígeno atmosférico y al calentarse este se promueve la oxidación lipídica de los triglicéridos obteniéndose índices de peróxidos mayores. Para los antioxidantes no hay grandes variaciones entre las repeticiones del mismo tratamiento esto se debe principalmente a que se utilizó la misma materia prima y las mismas condiciones. Esto se puede comprobar posteriormente en el análisis estadístico de los datos.

En la Figura 3.6, se muestra el comportamiento del índice de peróxidos (parámetro utilizado para medir la capacidad antioxidante) en función del tiempo.

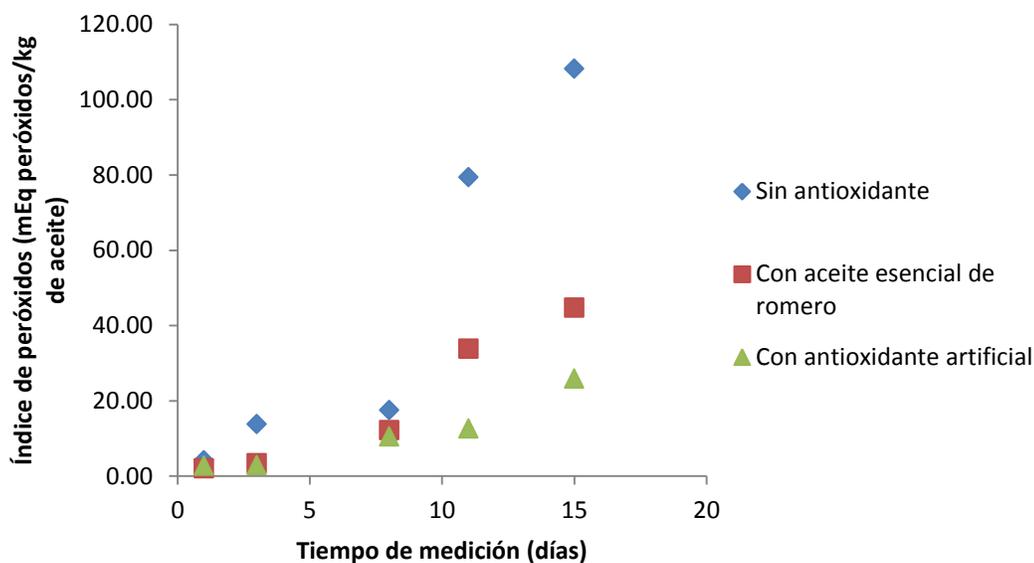


Figura 3.6. Índice de peróxidos de un aceite de soya en función del tiempo con diferentes tratamientos antioxidantes.

En la Figura 3.6, se observa más fácilmente lo anteriormente mencionado y el índice de peróxidos aumenta al pasar los días, en mayor grado para el aceite de soya sin ningún antioxidante y en menor grado para el aceite con antioxidante artificial (BHT). Además se observa que al inicio el índice de peróxido se mantiene casi igual para los tres tratamientos para después en el día 8 aumentar drásticamente señal de que el aceite se estaba oxidando.

Para determinar si la variación en el tiempo y en el tratamiento antioxidante es significativa, se deberá recurrir a un estudio estadístico, precisamente un Análisis de varianza (ANOVA por sus siglas en inglés) de dos factores. En cuyo caso la variable de respuesta será representada por el índice de peróxidos. A partir de este estudio se podrá determinar si la variación es consecuencia del error asociado a la medición, o por el contrario, existe una variación significativa en el método y no es repetible.

3.4. Comprobación del método análisis de varianza para la actividad antioxidante del aceite esencial de romero

Para comprobar que el método es preliminarmente reproducible y por lo tanto es confiable con 4 grados de libertad se realiza el análisis estadístico.

Como se mencionó anteriormente se observa un comportamiento creciente en el índice de peróxidos al pasar los días y se observa una diferencia entre los tratamientos aumentándose esta diferencia a los 8 días, 11 días y 15 días. Sin embargo es necesario realizar una prueba estadística en este caso un ANDEVA de dos factores, para demostrar si existe diferencia estadística significativa entre los índices de peróxidos analizados. Por lo tanto se realiza el ANDEVA en el programa JMP para determinar si hay diferencia significativa entre los promedios para los tres tratamientos propuestos y el factor tiempo donde el planteamiento de la hipótesis nula se describe con la ecuación 3.3.

$$H_0: \mu_{ij} = \mu_{hk} = \mu_3 \text{ si } p > \alpha = 0,05 \quad (3.3)$$

Y la correspondiente hipótesis alternativa se muestra en la ecuación 3.4.

$$H_0: \mu_{ij} \neq \mu_{hk} \text{ si } p < \alpha = 0,05 \quad (3.4)$$

Luego de introducir los datos al programa JMP, los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 3.6.

Cuadro 3.6. Análisis de varianza realizado para el índice de peróxidos de aceite de soya con diferentes tratamientos en el tiempo, con un 95 % de confianza ($\alpha=0,05$).

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Probabilidad
Factor	14	26957,76	1925,55	0,0001
Error	15	36,47	2,43	
Total	29	26994,24		

Como se observa en el cuadro 3.6, se observó que la probabilidad tiene un valor de 0,0001 y la significancia $\alpha=0,05$ por lo tanto con un 95 % de confianza se puede decir que cabe dentro de la zona de rechazo de la hipótesis nula, esta zona se encuentra en valores menores al valor de la significancia asignado ($\alpha=0,05$) para un 95 % de confianza.

Además se realiza una prueba de Tukey para todos los pares de tratamientos la cual se muestra en el Cuadro 3.7.

Cuadro 3.7. Análisis de medias por medio de la prueba de Tukey para el índice de peróxidos con tres tratamientos.

Tiempo (días)	Tratamiento	Índice de peróxidos promedio (mEq peróxidos/kg de aceite)
1	Sin antioxidante	4,14 ^H
1	Con aceite esencial	2,04 ^H
1	Con antioxidante artificial (BHT)	2,66 ^H
3	Sin antioxidante	13,74 ^{FG}
3	Con aceite esencial	3,37 ^H
3	Con antioxidante artificial (BHT)	2,83 ^H
8	Sin antioxidante	17,45 ^F
8	Con aceite esencial	12,17 ^{FG}
8	Con antioxidante artificial (BHT)	10,48 ^G

Cuadro 3.7 (continuación). Análisis de medias por medio de la prueba de Tukey para el índice de peróxidos con tres tratamientos.

Tiempo (días)	Tratamiento	Índice de peróxidos promedio (mEq peróxidos/kg de aceite)
11	Sin antioxidante	79,38 ^B
11	Con aceite esencial	33,78 ^D
11	Con antioxidante artificial (BHT)	12,55 ^{FG}
15	Sin antioxidante	108,20 ^A
15	Con aceite esencial	44,69 ^C
15	Con antioxidante artificial (BHT)	25,88 ^E

Esta prueba se realiza para un 95 % de confianza y se evalúa específicamente el promedio de los métodos utilizados y se le asigna una letra a cada valor obtenido o dos en caso de que se arroje que el promedio es igual a dos grupos. En este caso para tiempo de 1 día se observa que los tres tratamientos presentan un mismo índice de peróxidos puesto que los tres métodos (sin antioxidante, con aceite esencial y con antioxidante artificial) son señalados con la misma letra H, esto quiere decir que los tres promedios son cercanos entre sí y por lo tanto se concluye que para el día 1 las medias obtenidas no son significativamente diferentes.

En el día tres se observa que el índice de peróxidos promedio para el aceite esencial y para el antioxidante artificial son cercanos entre sí debido a que ambos presentan letra H arrojada mediante la prueba de Tukey. Además es posible observar que el aceite aun presenta el mismo índice de peróxidos calculado el primer día. El aceite sin ningún antioxidante sí presenta una media diferente a los anteriores debido a que este ya se ha comenzado a oxidar por no contar con un antioxidante que retarde este proceso.

En cuanto al octavo día analizado se observa el mismo comportamiento mencionado anteriormente, el aceite con antioxidante artificial presenta el mismo índice de peróxidos promedio que el que contiene aceite esencial de romero y el aceite que no contiene antioxidante sí presenta un media diferente a los anteriores.

Los días 11 y 15, se observa que los tres tratamientos presentan diferentes letras al asignarles las letras de la prueba de Tukey, esto quiere decir que con un 95% de confianza las medias obtenidas para el aceite sin antioxidante, con aceite esencial y con antioxidante artificial son diferentes.

Al comparar un mismo tratamiento en el tiempo se observa que el aceite de soja con aceite esencial presenta menos variación en sus promedios que el aceite sin antioxidante pero a su vez el aceite con BHT presenta aún menor variación, esto explica porque el aceite sin antioxidante se oxidaba más rápido que el aceite con antioxidante artificial y el que contenía aceite esencial.

Para considerar válidos un análisis de varianza se debe examinar los residuos para comprobar la normalidad de la prueba. Debido a que una de las condiciones a cumplirse es que los datos obtenidos muestren una distribución normal para realizar este análisis se grafican los residuos en tres gráficas (probabilidad normal, ajustes e histograma). En la Figura 3.7 se muestra la gráfica de probabilidad normal.

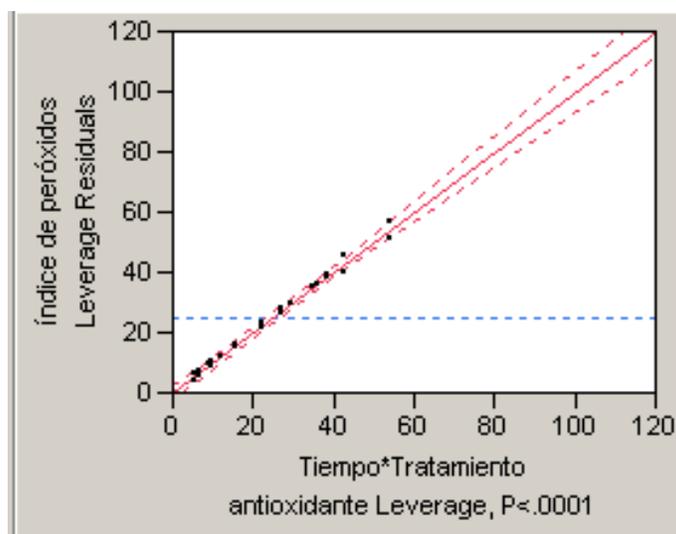


Figura 3.7. Gráfica de probabilidad normal para los residuos del análisis de varianza de dos factores para el índice de peróxidos del aceite de soja analizado.

La gráfica de probabilidad normal presenta los residuos distribuidos alrededor de la línea de distribución normal, esto es lo esperado ya que los puntos se deben distribuir a lo largo de la línea de normalidad lo cual se observa en la Figura 3.7. Por lo tanto la gráfica arroja

evidencia suficiente para comprobar la normalidad de los residuos y se busca respaldar el análisis de normalidad con otras gráficas. En la Figura 3.8, se muestra la gráfica de los residuos.

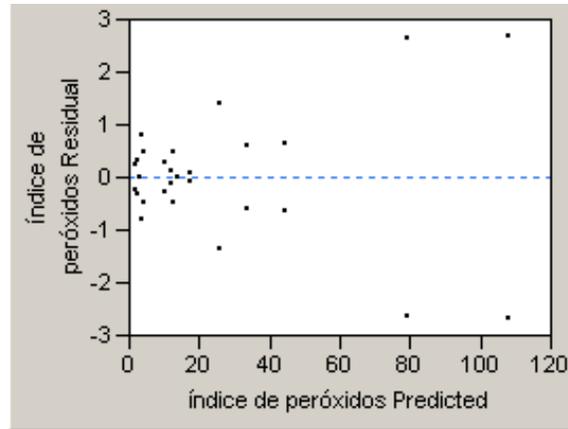


Figura 3.8. Gráfica de ajustes para residuos del análisis de varianza de un factor para el índice de peróxidos del aceite de soya analizado.

La gráfica de residuos contra los valores ajustados arroja una distribución de puntos simétrica a ambos lados de la recta lo cual es un posible indicador de una distribución normal de los datos. Además se observa que la gráfica muestra una clara tendencia por lo cual se puede decir que no existe un criterio para afirmar que los residuos tienen un comportamiento de distribución normal.

A continuación se muestra el histograma de los residuos en la Figura 3.9.

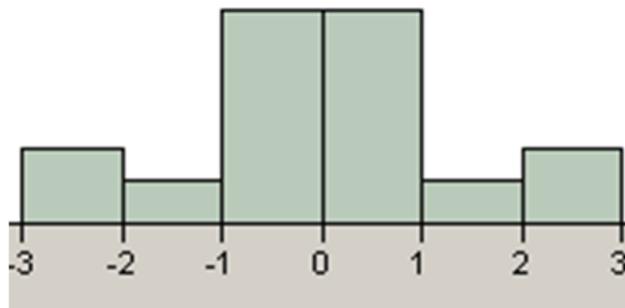


Figura 3.9. Histograma de los residuos para análisis de varianza de un factor para el índice de peróxidos del aceite de soya analizado.

El último gráfico que se debe analizar es el histograma de los residuos, en el gráfico mencionado se puede observar una ligera tendencia a una distribución normal pues se observa un valor alto cerca del centro y valores bajos en los extremos, este comportamiento es esperado en residuos que cumplen con el criterio de normalidad.

En este análisis estadístico los gráficos arrojan una evidencia conclusiva para tomar la decisión de aceptar la normalidad de los datos y por lo tanto es posible concluir que los residuos presentan una distribución normal para el índice de peróxidos del aceite de soya analizado.

Al tomar en cuenta las tres gráficas, y observar sus tendencias. Se concluye, que no existe evidencia significativa para afirmar que los residuos no se comportan de manera normal. Por lo tanto, se toma la decisión de aceptar que los datos son aleatorios, y el resultado del análisis ANOVA para el índice de peróxidos del aceite de soya presenta validez estadística.

Como se demostró en el análisis estadístico anterior este tiene validez estadística por ende se puede concluir con un 95 % de confianza que el aceite de soya con esencial de romero presenta efecto antioxidante igual al del aceite de soya con antioxidante artificial en los primeros ocho días del análisis para posteriormente aumentar el índice de peróxidos en el aceite con aceite esencial con respecto al del aceite con antioxidante artificial.

3.5. Caracterización del aceite esencial obtenido por el método de arrastre con vapor y utilizado en las pruebas antioxidantes.

En el Cuadro 3.8, se muestra los resultados de la cromatografía de gases realizados al aceite esencial de romero extraído por arrastre por vapor para determinar cuáles componentes presentan propiedades antioxidantes según la literatura.

Cuadro 3.8. Composición del aceite esencial extraído por arrastre con vapor determinada por medio de cromatografía de gases.

Componente	Composición (% m/m)
Triciclono	0,14
Organeno, alfa-tujeno	0,28
Alfa-pineno	24,99
Canfeno	3,81
Tuja-2,4(10)-dieno	0,52
Sabineno	0,07
Beta-pineno	3,30
Beta-mirceno	1,81
Alfa-terpineno	0,44
p-cimeno, p-cimol, canfogeno	0,47
Eucaliptol, Cineol	28,37
Gamma-terpineno	0,96
Hidrato de trans-sabineno	0,32
Linalool	3,87
Alfa-terpinoleno	0,67
3,5-heptdien-2-ol	0,67
Oxido de Alfa-pineno	0,08
(S)-cis-verbenol	0,39
Alcanfor, Biciclo heptan-2-ona	3,03
1,6-octadieno	0,11
Pinocarvona	0,36

Cuadro 3.8 (continuación). Composición del aceite esencial extraído arrojado por medio de cromatografía de gases.

Componente	Composición (%m/m)
Ciclopenteno-1-etanol	0,07
Borneol	3,64
Biciclo heptan-3-ona	0,84
3-ciclohexen-1-ol	1,15
Ciclohexen-1-metanol	2,52
Biciclo-hept-3-en-2-ona	10,26
3-penten-2-ona	0,11
Beta-citronellol	0,20
z-citral	0,13
(-).cis-Mirtanol	0,09
Trans-geraniol	3,36
E-citral	0,29
Bornil acetato	1,58
Geranil acetato	0,25
Trans-cariofileno	0,55

El análisis que se lleva a cabo para identificar los compuestos de los aceites esenciales y para determinar los porcentajes relativos de los mismos en la fracción volátil, se realiza mediante técnicas de cromatografía de gases e identificación de los compuestos por espectrofotómetro de masas acoplado al cromatógrafo (Pino *et al.*, 2010); y fue posible identificar 36 componentes de los 38 picos lanzados por el cromatógrafo.

Como se observa en el Cuadro 3.8, los principales componentes del aceite esencial de romero extraído fueron alfa-pineno (24,99 %), biciclo-hept-3-en-2-ona (10,26 %), eucaliptol (28,37 %), borneol (3,64 %) y alcanfor (3,03 %), estos coinciden con los compuestos mayoritarios encontrados por Tafurt *et al.*, 2005, el cual reporta 28,7 % de alcanfor, 15,9 % de eucaliptol y 10,4 % de alfa-pineno. Las condiciones agroecológicas del cultivo y los parámetros operacionales del proceso de extracción son las variables que

inciden sobre la composición y el rendimiento de los aceites esenciales. Las variaciones en las condiciones agroecológicas inducen cambios morfológicos, histológicos y fisiológicos en la planta. En un estudio realizado en Túnez se concluyó que la composición varía con el quimiotipo y las condiciones climáticas, entre las variedades estudiadas hubo variaciones significativas eucaliptol (20,34-45,79 %), alcanfor (8,5-30,17 %), alfa-pineno (6,53-13,1 %) y borneol (3,73-25 %) fueron los que con más frecuencia se encontraron (Zaouali *et al.*, 2005); estos coinciden también con los compuestos mayoritarios encontrados en el análisis cromatográfico realizado al aceite esencial de romero extraído. En otro estudio realizado en Argelia, se concluyó que los principales componentes del aceite esencial fueron 1,8-cineol (29,5 %), 2-etil-4,5-dimetilfenol (12,0 %), alcanfor (9,5%), borneol (9,4%), (+)-alfa-terpineol (9,2 %), alfa-pineno (7,5 %) y canfeno (5,0%), los cuales también coinciden, con los principales componentes encontrados, el alcanfor, borneol y alfa-pineno, aunque en diferentes proporciones (Touafek *et al.*, 2004). Un estudio llevado a cabo en Italia arrojó que los principales componentes del aceite esencial de romero fueron alfa-pineno, borneol, (-)-canfeno, alcanfor, verbenona y bornilacetato, los cuales en su mayoría coinciden con los compuestos mayoritarios encontrados en el aceite esencial de romero extraído (Angioni *et al.*, 2004).

Según la clasificación de compuestos realizada por Souza *et al* (2007) y Angioni *et al* (2004) en el aceite esencial analizado (extracción por arrastre con vapor) se encontraron monoterpenos como el alfa-pineno (24,99 %), beta-pineno (3,30 %) y beta-mirceno (1,81 %), mono terpenos oxigenados como el 1,8-cineol (28,37 %), alcanfor (3,03 %), borneol (3,64 %) y geraniol (3,36 %), y sesquiterpenos como el cariofileno (0,55%). Predominando en el aceite esencial extraído los monoterpenos como lo reporta la literatura (Stashenko, 2009).

Se han diferenciado tres quimiotipos diferentes de la planta de romero cineoliferum (alto porcentaje de 1,8-cineol), camforiferum (con más de un 20 % en alcanfor) y verbenoniferum (con más de un 15 % en verbenona). Si se observa el Cuadro 3.8, el aceite esencial presenta 28,3 % de cineol por lo que se puede decir que el quimiotipo extraído fue el cineoliferum, el cual presenta esta característica típica (alto contenido de cineol). Además, este casi no contiene verbenona y el contenido de alcanfor es bajo descartándose los otros dos quimiotipos (Muñoz, 2002).

Adicionalmente, otros estudios han mostrado que algunos aceites esenciales y sus fitoconstituyentes poseen la capacidad de atrapamiento del catión- radical 2,2'-azinobis- (3- etilbenzotiazolina- ácido sulfónico) ABTS+ y del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo DPPH igual o superior a la de antioxidantes sintéticos como la vitamina E, el trolox y el ácido ascórbico (Tafurt *et al.*, 2005).

En un estudio se determinó que el alfa-terpineno, alfa-terpinoleno y gamma-terpineno tenían capacidad antioxidante (Hyun-Jim Kin *et al.*, 2004). En otro estudio se determinó que el gamma- terpineno (0,96 %), mirceno (1,81 %), geraniol (3,36 %) y el terpinoleno (0,67 %) presentaban capacidad antioxidante alta y el alfa-pineno (24,99 %), beta- pineno (3,30 %), 1,8-cineol (28,37 %) y linalool (3,87 %) presentan capacidad antioxidante media, todos estos compuestos presentes en el aceite esencial extraído y cabe destacar que el alfa-pineno, beta-pineno, 1,8-cineol y el linalool se encuentran entre los componentes mayoritarios del aceite esencial analizado (Choi *et al.*, 2000). Además el cariofileno (0,55 %) es otro compuesto que presenta capacidad antioxidante en lípidos el cual también fue encontrado en la muestra analizada (Tafurt, 2003).

El mecanismo de la acción antioxidante de los aceites esenciales no se conoce con toda certeza. Sin embargo, en un estudio, se sugiere que el gamma-terpineno (0,96 %), presente en varios aceites esenciales incluido el extraído como se observa en el Cuadro 3.8, actúa como antioxidante al retardar la peroxidación del ácido linoleico, porque los radicales peroxilo formados a partir de éste (HOO.) reaccionan rápidamente con los radicales peroxilo del ácido linoleico (LOO.). De tal forma que se disminuye la concentración de los radicales peroxilo del ácido linoleico (LOO.) en el estado estacionario (Tafurt *et al.*, 2005). Esta podría ser la explicación para el efecto antioxidante encontrado en los primeros 8 días del análisis realizado.

4. Conclusiones y recomendaciones

a. Conclusiones

La comparación estadística de los métodos de extracción dio como resultado que existe una diferencia significativa para rechazar la hipótesis nula de que las mediciones son iguales, es decir, al menos uno de los procedimientos de extracción es diferente. Con la prueba de Tukey se concluye que el método de extracción por arrastre con vapor da porcentaje de rendimiento menor al obtenido por extracción con solventes (con hexano y etanol) con un 95 % de confianza.

La comparación estadística del índice de peróxidos en el tiempo muestra que no existe diferencia significativa en los primeros 8 días del análisis entre el antioxidante sintético y el aceite esencial extraído por el método de arrastre por vapor, además se muestra que a partir del tercer día el índice de peróxidos sin antioxidante es diferente a los otros dos tratamientos analizados.

El aceite esencial extraído por el método de arrastre por vapor contiene eucaliptol 28,37 %, alfa-pineno en un 24,99 % y 10,26 % Biciclo-hept-3-en-2-ona como componente mayoritarios, de los cuales todos presentan actividad antioxidante según la literatura consultada.

El quimiotipo extraído fue el *cineoliferum*, el cual presenta alto contenido de cineol como característica típica.

Los componentes minoritarios que se encontraron en el aceite esencial extraído que se ha demostrado que presentan capacidad antioxidante son mirceno, geraniol, gamma-terpineno, beta-pineno, linalool y terpinoleno.

El aceite esencial extraído con etanol presentó una consistencia pastosa y una coloración verdosa, debido a la extracción de clorofila, proteínas y celulosa, por lo tanto no es viable para utilizarse en aceites comerciales como antioxidante.

El aceite esencial extraído con hexano presentó una consistencia cerosa y una coloración amarillenta, debido a la extracción de ceras y polifenoles, por lo tanto no es viable para utilizarse en aceites comerciales como antioxidante.

b. Recomendaciones

Se recomienda el uso del aceite esencial extraído por arrastre por vapor para su evaluación como antioxidante natural en aceites comerciales, ya que presenta una mayor pureza, menor tiempo de extracción que conlleva en un menor gasto de agua en el condensador y de fuente de calentamiento, además presenta una coloración y una consistencia adecuada para el producto a evaluar.

Fabricar lotes más grandes para comprobar si se mantienen las características a una mayor escala.

Aplicar los métodos de extracción empleados en otros aceites esenciales (tomillo, orégano, albahaca, menta, entre otros), con el fin de determinar el porcentaje de rendimiento obtenido.

Determinar la propiedad antioxidante de aceites esenciales extraídos por arrastre con vapor de otras plantas aromáticas en aceites comerciales.

Determinar la propiedad antimicrobiana y anti fúngica del aceite esencia de romero extraído

Emplear otros disolventes de menor toxicidad como el propanol, para la extracción del aceite esencial de romero.

Considerando que las sustancias naturales presentes en los extractos analizados pueden ser responsables del efecto antioxidante, es preciso continuar el estudio de aislamiento y purificación de cada uno de los componentes para poder ser formulados en un futuro como posibles aditivos con actividad antioxidante en aceites comerciales.

Realizar comparaciones de la propiedad antioxidante del aceite esencial de romero con otras moléculas orgánicas que presentan esta propiedad como la vitamina A, ácido ascórbico y los tocoferoles.

5. Nomenclatura

<i>Símbolo</i>	<i>Descripción</i>	<i>Unidades</i>
m	Masa	g
P	Pureza	
V	Volumen	L
MM	Masa molar	g/mol
Cn	Concentración	mol/L
M	Molaridad	mol/L
H	Hipótesis	
g.l	Grados de libertad	
n	Número total de datos	
t	Tiempo	h
μ	Promedio	
p	Probabilidad	
α	Significancia estadística	
IP	Índice de peróxidos	mEq/kg TAG
<i>Subíndices</i>		
	i	Inicial
	m	Muestra

6. Bibliografía

- Adams, C. (1997). El rol de los antioxidantes en el mantenimiento de la calidad de la grasa. *Aceites y Grasas*.
- Angioni, A. Barra, E. Cereti; D. Barile; J. Coisson, M. Arlorio, S. Dessi, V. Coroneo, P. (2004). Chemical Composition, Plant Genetic Differences, Antimicrobial and antifungal Activity Investigation of the Essential Oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (11), 3530-3535
- Antolovich, M. Prenzler, P.D. Patsalides. E. McDonald, S. Robards, K. (2000). *Methods for Testing Antioxidant Activity. Analyst*.
- Arango, O., Hurtado, A., Castillo, P., & Santacruz, M. (2009). Estudio de las condiciones de extracción por arrastre con vapor del aceite esencial de laurel de cera (*Morella pubescens*). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 7(2), 40-48.
- Araya, H. Clavijo, C. Herrera, C. (2006). Capacidad antioxidante de frutas y verduras cultivados en Chile. *Revista Sociedad Latinoamericana de nutrición*, 56 (4), 361-365.
- Arcila, C. Loarca, G. Lecona, S. González, E. (2004). El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Revista Sociedad Latinoamericana de Nutrición*, 54 (1), 43-44.
- Atoui, A. K. Mansouri, A. Boskou, G. Kefalas, P. (2005). Tea And Herbal Infusions: Their Antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemical*
- Badui. (1991). Química de los alimentos. (2^a ed.). México D.F: Editorial Alhambra Mexicana
- Baharum, S. Bunawan, H. Ghani, M. Mustapha, W.Noar, N. (2010). Analysis of the Chemical Composition of the Essential Oil of *Polygonum minus* Huds. Using Two-

- Dimensional Gas Chromatography-Time-of-Flight Mass Spectrometry (GC-TOF MS). *Molecules* 15, 7006-7015.
- Bandoni, A. (2000). *Los recursos vegetales aromaticos en Latinoamérica* (1^a ed.). Buenos Aires, Argentina: CYTED.
- Barrera-Arellano, D. Ruiz-Mendez, V. Velasco, J. Marquez- Ruiz, G. Dobarganes, C. (2002). Loss of tocopherols and formation of degradation compounds at frying temperatures in oils differing in degree of unsaturation and natural antioxidant content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 82, 1696–1702
- Bauer, A. Kurt, G. Garbe, D. (2001). *Common Fragrance and Flavor Materials. Preparation, Properties and Uses* (4^a ed). Alemania: Wiley-VCH. Weinheim (Germany)
- Braverman, J. (1980). *Introducción a la Bioquímica de los Alimentos. en Oxidación de*. Mexico: Editorial El manual moderno
- Bruun-Jensen, L. Skovgaard, M. Skibsted, L. Bertelsen, G. (1994). Antioxidant Synergism Between Tocopherols And Ascorbyl Palmitate In Cooked, Minced Turkey. *Z. Lebensm Unters Forsch*. 199, 210-213.
- Castañeda, M., Muñoz, A., Martínez, J., & Stranshenko, E. (2007). Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas. *Scientia et Technica*. 13 (33), 165-166
- Chávez, L. Escalante, G. Estrada, E. Castañeda, F. (2008). Efecto sinérgico del aceite esencial de *Origanum vulgare* a la Gentamicina en cultivos de *Escherichia coli*. *Revista CIMEL*, 13(2), 45-48.
- Chaudhary, A. Nokubo, M. Reddy, G. Yeola, S. (1994). Detection of Endogenous Malondialdehyde-Deoxyguanosine Adducts In Human Liver. *Science*, 265, 1580-1582.
- Choi, H. Song, H. Ukeda, H. Sawamura, M. (2000). Radical- scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 48, 4156.

- Dhatapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos Fitoterapéuticos*. Santa Fe de Bogotá, Colombia: Editorial Quebecor-Impreandes.
- Dustan, A. Harris, S. (1994). Oxygen free radicals and antioxidants. *Journal of Enviroment*. 34 (9): 26 – 35.
- Esquivel, A. Vargas, P. (2007). Uso de aceites esenciales extraídos por medio de fluidos supercríticos para la elaboración de alimentos funcionales. *Tecnología en Marcha*, 20 (8), 41-50
- Estrada , S. (2010). *Determinación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos de romero (Rosmarinus officinalis) y tomillo (Thymus vulgaris)*, (Tesis de grado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- García, E., Quezada, M., Moreno, J., Sánchez, H. Moreno, E. & Pérez, M. (2006). Actividad Antifúngica de aceites esenciales de Canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) y Orégano (*Origanum vulgare* L.) y su efecto Sobre la Producción de aflatoxinas en Nuez. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24, 8-12.
- Granados, C., Yáñez, Y., Santafé, G. (2012).Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander. *Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*. 10(1),12-23.
- Grob, L. (1995). *Modern practice of gas chromatography*. New York:John Wiley & Sons.Inc
- Guala, M., Pérez, G., Barducco, L., Marsó, A., & Elder, H. (2012). Obtención de fracciones enriquecidas durante la extracción de aceites esenciales crudos. *Avances en ciencia y tecnología*, 3(1), 151-157.
- Gutiérrez Peláez, E., Cifuentes Beltrán, M., Álvarez Estrada , J., Ríos Escobar, J., Ángel Serna, L., & Morales Ríos, D. (2010). Estudio farmacognosico para el cuidado de

- la salud a partir de aceites esenciales obtenidos por destilación de arrastre de vapor. *Investigaciones ANDINA*, 12, 8-18.
- Hyun-in, W. Feng, W. Changqing, X. (2004). Evaluation of antioxidant activity of Australian Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*), oils and its components, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52 (10), 2849-2854.
- Kitson, G. Fulton., Larsen, S. Barbara., Mcewen, N. Charles. (1996). Gas Chromatography and Mass Spectrometry. California: A Practical Guide. Academic Press
- Kuskoski, M. Asuero, A. Garcia, M. Troncoso, A. Fett, R. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Revista Ciencia y tecnología de alimentos*, 24 (4), 45-46
- Lawrence, B. (2003). Essential Oils. Editor Natural Flavor and Fragrance, Materials Perfumer & Flavorist. *Allured Publishing Corporation*. 2003, 26-29
- Leyva, M. Marquetti, M. Tacoronte, J. Scull, R. Tiomno, O. (2009). Actividad larvicida de aceites esenciales de plantas contra *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Revista Biomedica* 2009 (20) 5-13
- Martinello, M. Pamparo, M. (2005). Poder antioxidante de extractos de romero concentrados por destilación molecular. *Información tecnológica*. 16 (5), 17-20
- Martínez, A. (2003). Aceites esenciales. *Revista de Universidad de Antioquia*, 13 (1), 13-16
- Masada, Y. (1997). Analysis of Essential Oils by gas chromatography and Mass spectrometry, New York: Ed, John Wiley
- Matiz, G. Osorio, M. Camacho, F. Atencia, M. Herazo, J. (2012). Diseño y evaluación *in vivo* de fórmulas para acné basadas en aceites esenciales de naranja (*Citrus sinensis*), albahaca (*Ocimum basilicum* L) y ácido acético. *Biomédica: Revista del Instituto Nacional de Salud*. 32(1)
- Medina, L. (1997). Protección de aceites con antioxidantes. *Soya noticias*. 251, 6 –10.
- Morrison, R. Boyd, R. (1990). Química Orgánica. New York: Editorial Addison –Wesley Iberoamericana

- Muñoz, L. (2002). Plantas medicinales españolas. *Rosmarinus officinalis* L. (*lamiaceae*) (Romero), *Revista Ediciones de Universidad de Salamanca*, 2002 (21), 105-118
- Muñoz, F. (2002). *Plantas medicinales y aromáticas (Cultivo y procesado)*. (4ª ed.). Madrid. España: Ediciones: Mundiprensa
- Nawar, W. Kim, M. Vajdi, E. (1991). Measurement of oxidative interactions of cholesterol. *J. American Oil Chemical Society*. 68: 496–498.
- Neira, M. Heinsohn, P. Carrillo, R. Báez, A. Fuentealba, J. (2003). Efecto de Aceites Esenciales de Lavanda y Laurel sobre el Ácaro *Varroa destructor* Anderson & Truemann (Acari:Varroidae). *Revista Agrícola Técnica*. 64 (3)
- Pasto, D. Johnson, C. (2003). *Determinación de estructuras químicas*. Barcelona, España: Editorial Reverté
- Percival, M. (1998). Antioxidants. *Clin. Nutr. Insight*, 31, 1-4.
- Peredo, H. Palou, E. García, A. (2009). Aceites esenciales: Métodos de extracción. *Temas selectos en Ingeniería de Alimentos 3 (1)*, 24-32
- Petukhov, I. Malcolmson, L. Przybylski, R. Armstrong, L. (1999). Storage stability of potato chips fried in genetically modified canola oils. *JAOCS*. 76: 889–896.
- Pino, N., Meléndez, E., & Stashenko, E. (2010). Composición Química del aceite esencial de hojas de orégano cultivado en Quibdó, Colombia. *Academic Journal*, 29(2), 171-176.
- Pokorny, J. Yanishlieva, N. Gordon, M. (2001). *Antioxidants in food practical applications*, Cambridge: Woodhead Publication
- Pomilio, A. Seldes, A. Burtón, G. (1985). Introducción al estudio de los productos naturales. *Monografías OEA*. 54 (30), 1-3.
- Ray, M. (2002). *Flavor, fragrance and odor analysis*. New York: Editorial Marcel Dekker.
- Romero, M. (2004). *Plantas aromáticas: Tratado de aromaterapia científica*. Argentina: Editorial Kier.

- Romeu, C. Botta, E. Díaz, Y. (2007). Caracterización fitoquímica del aceite esencial de romero (*Rosmarinus Officinalis L.*) y evaluación in vitro de su actividad acaricida. *Revista del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal*, 11 (2), 75-78
- RUA. (2009). *Cromatografía de gases*. España: Universidad de Alicante
- Sánchez, F. (2006). Extracción de aceites esenciales (Experiencia colombiana). *Revista Universidad Nacional de Colombia*, 2006 (5)
- Sánchez, D. (2012). *Estudio del potencial antioxidante de la mora (Rubus glaucus benth) y sus cambios en función del proceso de maduración y bajo diferentes temperaturas de almacenamiento*. (Tesis de maestría inédita). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia
- Santana, O. Cabrera, R. Giménez, C. González, A. Sánchez, R. de los Mozos, M. Herraiz, D. (2012). Perfil químico y biológico de aceites esenciales de plantas aromáticas de interés agro-industrial en Castilla-La Mancha (España). *Centro de Investigación Agraria de Albaladejito*, 63(2) 214-222.
- Satinder A. (2003) *Chromatography and separation science*. USA: Editorial Elsevier Science
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos Fitoterapéuticos* (1ª ed.). Bogotá, Colombia: Editorial Convenio Andrés Bello.
- Shibamoto, T. (1981). Analysis of Essential Oils, In: Jennings, W. Gedt, Applications of Glass Capillary Gas chromatography. New York: Editorial Marcel Decker
- Sereitia, M. Abu, K. Sena, P. (1999). Farmacología de romero (*Rosmarinus officinalis Linn.*) y sus potencialidades terapéuticas. *Indian Journal of Experimental Biology*, 37 (3) 124-131
- Skoog, D. West, D. (2015). *Fundamentos de Química Analítica*. (9ª ed.). México: Cengage Learnig Editores

- Souza, T. Apel, S. Bordignon, A. & Matzenbacher, N. (2007). Chemical composition and antioxidant activity of the volatile oil from *Eupatorium polystachyum*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*: 17(3)
- Stashenko, E. Ruíz, C. Arias, G. Durán, D. Salgar, W. Cala, M. Martínez, M. (2010). *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS analysis and PCA. *Science*. 2010 (33), 93-103.
- Stashenko, E. (2009). *Aceites esenciales*. (1ª ed.). Colombia: Cenivam
- Tafurt, G. Martínez, J. Stashenko, E. (2005). Evaluación de la actividad antioxidante de aceites esenciales en emulsiones degradadas por radiación ultravioleta. *Revista colombiana de química*, 34 (1), 43-55.
- Tafurt, G. (2003). Evaluación de la actividad antioxidante de tres aceites esenciales en emulsiones tipo margarina degradadas por radiación ultravioleta (Tesis de posgrado). Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia
- Terradez, M. (2005). Análisis de varianza. UOC.
- Touafek, O.; A. Nacer; A. Kabouche; Z. Kabouche; C. Bruneau. (2004). Chemical Composition of the Essential Oil of *Rosmarinus officinalis* Cultivated in the Algerian Sahara, *Chemistry of Natural Compounds* 40 (1), 28-29
- Valenzuela, A. Nieto, S. (1996). Synthetic and natural antioxidants: food quality protectors. *Grasas y Aceites*, 47(3), 186-196.
- Wanasundara, U. Amarowicz, R. Shahidi, F. (1994). Isolation and Identification of Antioxidative Component in Canola Meal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42, 1285-1290.
- Wankat, P. (2008). *Ingeniería de procesos de separacion*. (2ª ed.). México D.F. México: Editorial Pearson Prentice Hall
- Yagues, V. (2008). *Cromatografía de gases*. Valencia, España: Editorial Universidad de Valencia.

- Young, I. Woodside, J. (2001). Antioxidants in Health and Disease. *Journal Clinical Pathologist*. 54, 176-186.
- Zaouali, Y. Messaoud, C. Ben Salah, A. Boussaid, M. (2005). Oil Composition Variability Among Populations in Relationship with Their Ecological Areas in Tunisian *Rosmarinus officinalis*, *Flavour and Fragrance Journal* 20 (5), 512-520.
- Zygodlo, J. Lamarque, A. Maestri, D. Grosso, N. R. (1995). Empleo De Aceites Esenciales Como Antioxidantes Naturales. *Grasas Y Aceites*, 46 (4), 285-289

7. Apéndices

Apéndice A: Datos experimentales

Cuadro A.1. Masas para determinar el % de rendimiento de aceite esencial de romero por extracción con solventes etanol.

Medición	Masa (g)		
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
Balón	104,99	106,21	111,58
Romero seco	20,23	20,69	20,67
Balón + aceite esencial	113,22	111,3	117,09
Aceite esencial	8,23	5,09	5,51

Cuadro A.2. Masas para determinar el % de rendimiento de aceite esencial de romero por extracción con solventes hexano.

Medición	Masa (g)		
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
Balón	106,29	109,41	108,67
Romero seco	19,87	19,94	20,28
Balón + aceite esencial	108,82	115,62	112,63
Aceite esencial	2,54	6,21	3,96

Cuadro A.3. Masas para determinar el % de rendimiento de aceite esencial de romero por extracción con arrastre por vapor de agua.

Medición	Masa (g)		
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
Romero seco	19,87	19,94	20,28
Vial	12,30	13,41	13,27
Vial+ aceite esencial	15,34	16,43	16,29
Aceite esencial	3,04	3,02	3,03

Cuadro A.4. Masas de tiosulfato de sodio pentahidratado para preparar la disolución patrón para realizar la valoración del índice de peróxidos en el tiempo de la corrida 1, 97% de pureza.

Día	Masa tiosulfato de sodio pentahidratado (g)	Volumen balón (mL)
1	0,619	250,00
3	0,624	250,00
8	0,656	250,00
11	0,650	250,00
15	0,654	250,00

Cuadro A.5. Masas de tiosulfato de sodio pentahidratado para preparar la disolución patrón para realizar la valoración del índice de peróxidos en el tiempo de la corrida 2, 97% de pureza.

Día	Masa tiosulfato de sodio pentahidratado (g)	Volumen balón (mL)
1	0,627	250,00
3	0,619	250,00
8	0,646	250,00
11	0,647	250,00
15	0,646	250,00

Cuadro A.6. Masas de aceite para determinar el índice de peróxidos en el tiempo y volumen de disolución de tiosulfato de sodio consumido de la corrida 1 (sin antioxidante por triplicado).

Día	Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3	
	Masa aceite (g)	Volumen de disolución (mL)	Masa aceite (g)	Volumen de disolución (mL)	Masa aceite (g)	Volumen de disolución (mL)
1	1,075	0,40	1,089	0,70	1,096	0,40
3	1,078	1,30	1,058	1,50	1,047	1,90
8	1,016	1,75	1,021	1,80	1,013	2,10
11	1,048	8,50	1,156	9,00	1,047	9,00
15	1,201	14,50	1,051	7,00	1,195	13,00

Cuadro A.7. Masas de aceite para determinar el índice de peróxidos en el tiempo y volumen de disolución de tiosulfato de sodio consumido de la corrida 1 (con aceite esencial por triplicado).

Día	Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3	
	Masa aceite (g)	Volumen de disolución (mL)	Masa aceite (g)	Volumen de disolución (mL)	Masa aceite (g)	Volumen de disolución (mL)
1	1,187	0,15	1,074	0,25	1,078	0,30
3	1,157	0,30	1,158	0,50	1,045	0,55
8	1,031	1,35	1,012	1,25	1,033	1,20
11	1,067	3,50	1,017	2,50	1,204	5,00
15	1,237	3,00	1,158	5,15	1,075	4,95

Cuadro A.8. Masas de aceite para determinar el índice de peróxidos en el tiempo y volumen de disolución de tiosulfato de sodio consumido de la corrida 1 (con antioxidante comercial por triplicado).

Día	Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3	
	Masa aceite (g)	Volumen de disolución (mL)	Masa aceite (g)	Volumen de disolución (mL)	Masa aceite (g)	Volumen de disolución (mL)
1	1,043	0,15	1, 167	0,40	1,154	0,35
3	1,018	0,30	1, 207	0,35	1,1 35	0,75
8	1,014	1,20	1, 011	0,90	1,200	1,30
11	1, 074	1, 50	1, 125	0,45	1, 018	1,25
15	1, 386	2,75	1, 103	2,95	1,156	3,15

Cuadro A.9. Masas de aceite para determinar el índice de peróxidos en el tiempo y volumen de disolución de tiosulfato de sodio consumido de la corrida 2 (sin antioxidante por triplicado).

Día	Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3	
	Masa aceite (g)	Volumen de disolución (mL)	Masa aceite (g)	Volumen de disolución (mL)	Masa aceite (g)	Volumen de disolución (mL)
1	1,195	0,45	1,139	0,60	1, 045	0,50
3	1, 064	1, 50	1, 043	1,10	1, 037	1, 80
8	1, 004	1, 70	1,011	1, 70	1, 080	1, 90
11	1, 025	8, 50	1,039	7, 60	1, 152	8, 70
15	1,031	5, 90	1,094	13, 90	1, 095	11,30

Cuadro A.10. Masas de aceite para determinar el índice de peróxidos en el tiempo y volumen de disolución de tiosulfato de sodio consumido de la corrida 2 (con antioxidante comercial por triplicado).

Día	Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3	
	Masa aceite (g)	Volumen de disolución (mL)	Masa aceite (g)	Volumen de disolución (mL)	Masa aceite (g)	Volumen de disolución (mL)
1	1,036	0,25	1,173	0,30	1,146	0,25
3	1,215	0,35	1,008	0,25	1,127	0,70
8	1,004	1,30	1,006	1,00	1,251	1,20
11	1,065	1,30	1,113	1,30	1,011	1,20
15	1,486	2,70	1,085	2,60	1,137	2,90

Cuadro A.11. Masas de aceite para determinar el índice de peróxidos en el tiempo y volumen de disolución de tiosulfato de sodio consumido de la corrida 2 (con aceite esencial por triplicado).

Día	Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3	
	Masa aceite (g)	Volumen de disolución (mL)	Masa aceite (g)	Volumen de disolución (mL)	Masa aceite (g)	Volumen de disolución (mL)
1	1, 195	0,25	1,075	0,20	1, 097	0,20
3	1,148	0,30	1, 258	0,20	1, 021	0,50
8	1,021	0,30	1,021	1,20	1,090	1,20
11	1,064	3,60	1,009	2,40	1,198	4,80
15	1,216	2,70	1,126	4,85	1,075	4,80

Apéndice B: Resultados intermedios.

Cuadro B.1. Concentración de tiosulfato de sodio pentahidratado de la disolución patrón para realizar la valoración del índice de peróxidos en el tiempo de la corrida 1, 97% de pureza.

Día	Concentración disolución patrón de tiosulfato de sodio pentahidratado (mol/L)
1	0,0098
3	0,0097
8	0,0099
11	0,0101
15	0,0102

Cuadro B.2. Concentración de tiosulfato de sodio pentahidratado de la disolución patrón para realizar la valoración del índice de peróxidos en el tiempo de la corrida 2, 97% de pureza.

Día	Concentración disolución patrón de tiosulfato de sodio pentahidratado (mol/L)
1	0,0097
3	0,0098
8	0,0103
11	0,0102
15	0,0102

Cuadro B.3. Índice de peróxidos en el tiempo para determinar la capacidad antioxidante del aceite esencial de romero en el tiempo.

Día	Índice de peróxidos (mEq peróxidos/kg de aceite)					
	Sin antioxidante		Con antioxidante artificial		Con aceite esencial de romero	
	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 1	Corrida 2
1	4,63	3,65	2,34	2,97	1,80	2,28
3	13,75	13,72	2,81	2,85	2,55	4,18
8	17,37	17,53	10,19	10,77	12,05	12,28
11	76,74	82,01	12,06	13,04	34,38	33,18
15	105,51	110,88	24,50	27,26	44,04	45,33

Apéndice C: Muestra de cálculo

C.1. Rendimiento de extracción

La fórmula para calcular el rendimiento de la extracción de aceite esencial de romero es:

$$\%Extracción = \frac{m_i - m_p}{m_i} \times 100$$

Utilizando los valores del Cuadro A.1, fila 1, columna 2; Cuadro A.1, fila 3, columna 2.

$$\%Extracción = \frac{8,23 \text{ g}}{20,23 \text{ g}} \times 100 = 40,7 \%$$

El resultado se encuentra en Cuadro 3.4.1, fila 1, columna 2.

C.2. Concentración de tiosulfato de sodio pentahidratado.

La fórmula para calcular la concentración de tiosulfato de sodio pentahidratado es:

$$Cn_{tiosulfato \text{ de sodio}} = \frac{m_{tiosulfato \text{ de sodio}} * P}{V_{balón} * MM_{tiosulfato \text{ de sodio}}}$$

Utilizando los valores del Cuadro A.4, fila 1, columna 1; Cuadro A.1, fila 1, columna 3.

$$C_{n_{\text{tiosulfato de sodio}}} = \frac{0,619 \text{ g} * 0,97}{0,25 \text{ L} * \frac{248,1841}{\text{mol}} \text{ g}} = \frac{0,0097 \text{ mol}}{\text{L}}$$

El resultado se encuentra en Cuadro B.2, fila 1, columna 2.

C.3. índice de peróxidos del aceite de soya.

La fórmula para calcular la concentración de aceite de soya es:

$$IP = \frac{((V_m - V_b) * M)_{Na_2SO_3} * \frac{1 \text{ mEq } I_2}{1 \text{ mEq } Na_2SO_3} \frac{1 \text{ mEq peróxidos}}{1 \text{ mEq } I_2}}{\frac{m_m * \%Grasa * 1kg}{100 * 1000g}}$$

Utilizando los valores del Cuadro A.6, fila 2, columna 2; Cuadro A.6, fila 2, columna 3.

$$IP = \frac{(0,40 - 0,00) \text{ mL} * \frac{0,0097 \text{ mEq } Na_2SO_3}{\text{L}} \frac{1 \text{ mEq } I_2}{1 \text{ mEq } Na_2SO_3} \frac{1 \text{ mEq peróxidos}}{1 \text{ mEq } I_2}}{\frac{1,075 \text{ g} * 100 \% * 1kg}{100 * 1000g}} = \frac{3,65 \text{ mEq}}{\text{kg TAG}}$$

El resultado se encuentra en el Cuadro B.3, columna 3, fila 1.

Apéndice D: Procedimientos

D.1. Pretratamiento de las hojas de romero

1. Se secaron por 2 días a 40°C en un secador de aire caliente.
2. se separó las hojas del resto de la planta ya seca.
3. Se molieron las hojas en una licuadora.

D.2. Extracción del aceite esencial por el método Soxhlet con solventes (etanol y hexano).

1. Por triplicado, se pesa aproximadamente 20 g de romero seco y molido en paquetes de papel filtro y se coloca en el equipo Soxhlet.
2. Se arma el equipo con el Soxhlet, el balón, el calentador y el condensador y se colocan las mangueras en el condensador.
3. Se enciende el calentador progresivamente y se abre el agua del condensador hasta que se obtenga un flujo uniforme.
4. Se agregan aproximadamente 100 mL del solvente a utilizar en balones de 250 mL con fondo plano., y se espera a que comience a hervir el solvente en el balón.
5. Se deja el equipo hasta que concluyan 25 sifonazos o 8 horas de operación.
6. Se pesa el aceite esencial extraído por diferencia.

D.3. Extracción del aceite esencial por el método de arrastre por vapor

1. Por triplicado, se pesa aproximadamente 150 g de romero seco y molido y se colocan en balones de 2 L.
2. Se arma el equipo con la trampa Clavenger, el balón, el calentador y el condensador y se colocan las mangueras en el condensador.
3. Se enciende la plantilla y se abre el agua del condensador hasta que se obtenga un flujo uniforme.
4. Se agregan aproximadamente 600 mL del agua en balones de 2 L, y se espera a que comience a hervir el solvente en el balón.
5. Se deja el equipo hasta que concluyan aproximadamente 3 horas de operación.
6. Se pesa el aceite esencial extraído por diferencia.

D.4. Determinación del índice de peróxidos

1. Por duplicado, pese masas de 1,0 g de la muestra a analizar en sendos frascos yodimétricos de 250 ó 500 mL,
2. Agregue a cada frasco yodimétrico, 10 mL de cloroformo (medido con probeta). Disuelva la muestra.
3. Agregue, a cada frasco yodimétrico: 15 mL de ácido acético glacial, una punta de espátula de bicarbonato de sodio y 2 mL de disolución saturada de yoduro de potasio. Tape, agite y mantenga en la oscuridad durante una hora.
4. Añade 30 – 50 mL de agua destilada y 5 mL de disolución indicadora de almidón.
5. Valore con una disolución patrón de tiosulfato de sodio 0,001 mol/L, hasta que el color azul desaparezca.

D.5. Cromatografía de gases del aceite esencial.

1. Se enciende el cromatógrafo de gases y se espera por 10 minutos aproximadamente para eliminar impurezas de la columna.
2. Se inyecta la muestra (2 μ L) al cromatógrafo por medio de una jeringa graduada y se espera por 30 minutos a que toda la muestra pase la columna.