5. METODOLOGÍA

5.I. Materiales

5.I.I. Destilación por Arrastre de Vapor

Las muestras de romero (*Rosmarinus Officinalis*), se obtuvieron recién recolectadas de la Central de Abasto de Puebla. La planta fue ventilada para remover la humedad, y se mantuvo en un lugar seco y fresco alejado de los rayos solares para permitirle secarse aproximadamente durante 30 días. Posteriormente a su secado, se separo manualmente la hoja y el tallo del romero, conservando únicamente las hojas, que son el objeto de estudio de esta investigación. Para la extracción con arrastre de vapor se utilizó agua grado bidestilada (Proveedor: FRR).

Figura 5.I. Muestra de romero

5.1.2. Determinación de Actividad Antioxidante

En la determinación de la capacidad depuradora del radical 2,2-difenil-picrahidrazil (DPPH), se empleó etanol al 96% (v/v) grado industrial (Proveedor: Química Industrial Olympus SA de CV) y una solución de DPPH 1mM (Proveedor: Sigma-Aldrich) que debe prepararse diariamente pesando 0.0394 g de DPPH y aforar con etanol a 100ml, está solución debe cubrirse con papel aluminio y mantenerse en la obscuridad y refrigeración entre cada medición.

5.1.3. Determinación del Contenido de Fenoles Totales

Para esta prueba se necesita una solución stock de catecol 10 mM, (Proveedor: Sigma Aldrich) preparada al disolver 1.10 g de catecol ($C_6H_6O_2$) a 100 ml de agua bidestilada (Proveedor: FRR), carbonato de sodio 1.4 M (Proveedor: Almacén de reactivos UDLAP) obtenida al aforar a 1 litro 148.4 g de carbonato (Na_2CO_3), reactivo de Folin-Ciocalteu (Proveedor: Merck) y ácido tricloroacético, (Proveedor: Merck) al 10% (p/v), para ello se pesaron 10 g del ácido (CCl_3COOH) y se aforo a 100 ml.

5.1.4. Preparación de Aceite

Tanto para la determinación de la actividad antioxidante, como para el contenido de fenoles totales se prepararon 3 soluciones de aceite de romero para evaluarlo a diferentes concentraciones. La primera solución se preparó al aforar 10µl del aceite puro con agua bidestilada a 50 ml, para las otras dos soluciones se tomaron 350 y 900 µl de aceite y ambas se llevaron a volumen de 25 ml.

Los tres matraces se cubrieron con papel aluminio y se mantuvieron en refrigeración entre cada prueba.

5.2. Métodos

5.2.1. Extracción del Aceite Esencial

La extracción del aceite esencial del romero se hizo mediante destilación por arrastre de vapor (Véase apartado 4.4.2.1), para lo cual, se empleo un equipo modelo EOV2000, el cual se muestra en la figura 5.2., el sistema consta de los siguientes componentes: parrilla (Modelo: Buffet Range, Munsey), rejilla de metal, matraz de vidrio de 2 L en dónde se da la generación de vapor, perlas de ebullición, matraz para la muestra de romero, red plastificada, cabeza del destilador, condensador adaptado a un refrigerante, auto-separador con válvula, dos abrazaderas, tela de asbesto, tres termómetros, un baño recirculador (Modelo: Polysat, Cole Parmer) para enfriamiento, dos mangueras, matraz de 500 ml para la recepción del agua condensada y frascos color ámbar para conservar el aceite hasta su uso.

Figura 5.2. Equipo de destilación por arrastre de vapor.

Inicialmente se agregaron 1200 ml de agua bidestilada en el matraz de ebullición de 2 L, así como seis perlas de ebullición y se colocó sobre la parrilla con una rejilla de metal intermedia para evitar que el calor se propague directamente al matraz, posteriormente se puso un corcho con un termómetro en una de las bocas del matraz para poder medir constantemente la temperatura de ebullición. Se pesaron los gramos necesarios de romero en una báscula (Modelo: Precisa 180A) y se introdujeron en el matraz poniendo una malla plastificada para retener la muestra y permitir el paso del vapor, se montó sobre el primer matraz y se le cubrió con una tela de asbesto que funciono como aislante para optimizar el calentamiento.

A continuación se ensamblo la cabeza del destilador al matraz de la muestra y al refrigerante con su respectiva abrazadera y termómetro en la parte superior. Asimismo, se conectó la entrada y salida del serpentín del refrigerante a un sistema de agua de enfriamiento, encargado de bombear y enfriar el agua mediante un baño recirculador. Por último, se agregaron 10 ml de agua bidestilada al auto-separador para evitar pérdidas de aceite, se acoplo al refrigerante con una abrazadera y se puso un recipiente para la recepción del agua condensada.

Una vez listo el equipo de destilación, se enciende el sistema de refrigeración y se coloca un termómetro en el sistema para controlar la temperatura durante todo el proceso de destilación, el agua de enfriamiento debe mantenerse a una temperatura máxima de 6°C, antes de iniciar es necesario verificar que ninguna conexión presente fugas.

Para iniciar la destilación se conecta y enciende la parrilla de calentamiento, la experimentación fue iniciada a 23°C y presión atmosférica. El control de temperatura se mantuvo en medio hasta que comenzó la ebullición, aproximadamente al minuto 8, entonces el nivel de temperatura se baja a Medio-Medio para controlar la destilación:

Figura 5.3. Control de parrilla de calentamiento

Cuando el vapor generado sube a la cabeza del destilador, se condensa y comienza la obtención del aceite, el líquido extraído (agua y aceite) se acumula en el auto-separador donde se observa la separación de fases (Fig. 5.4.). El tiempo de extracción fue aproximadamente de 3 horas, una vez transcurrido dicho tiempo, se apaga la parrilla y el equipo de refrigeración. A continuación se abre la válvula para liberar el agua resultante de la destilación y por diferencia de densidades se separa del aceite, obteniendo así un aceite esencial puro, el cual fue pesado y almacenado en frascos ámbar hasta su utilización.

Figura 5.4. Aceite extraído durante la destilación.

5.2.2. Propiedades Físicas del Aceite

La densidad se obtiene a partir de la siguiente ecuación:

$$\rho = \frac{\text{Masa}}{\text{Volumen}}$$

Para su determinación tomar una probeta de 10 ml, pesarla y agregar 1 ml del aceite concentrado, pesarla nuevamente y por diferencia pesos se obtiene la masa, por lo tanto la densidad del aceite. Repetir la medición 3 veces.

El índice de refracción se mide con un refractómetro (marca: ATAGO). Inicialmente calibrar el aparato a 0 con agua destilada, secar con papel y colocar dos gotas del aceite de romero concentrado. El resultado se obtiene girando la perilla hasta que la marca queda centrada en la pantalla.

5.2.3. Determinación de Actividad Antioxidante

Para determinar la actividad antioxidante se siguió el método que consiste en la neutralización de los radicales libres de 2,2-difenil-picrahidrazil (DPPH) por el antioxidante presente en el aceite esencial del romero, para ello se colocaron alícuotas de 0.1 a 0.5 ml de la solución de aceite de romero (preparadas en el punto 5.1.4) en tubos de ensaye y se añadieron 300 µl de solución 1mM de DPPH, posteriormente se agregó etanol hasta llegar a un volumen de 3 ml en cada tubo. También se preparó un blanco de DPPH con 300 µl de DPPH y 2.7 ml de etanol. Todas las muestras se dejan reaccionar durante 15 min manteniéndolas a temperatura ambiente y en la oscuridad. (García, 2006)

Transcurrido ese tiempo, se determinó la absorbancia a 517 nm usando etanol como blanco en un espectrómetro UV-Visible (Modelo: Cary 100, Varian). Para determinar el % de inhibición se utilizó la siguiente fórmula:

$$\%\,\text{Inhibición} = \frac{A_{DPPH} - A_{extracto}}{A_{DPPH}} \times 100$$

Donde A_{DPPH} es la Absorbancia de la muestra blanco de DPPH y $A_{extracto}$ es la absorbancia de las soluciones preparadas (Peng et al, 2007).

5.2.4. Determinación del Contenido de Fenoles Totales

Los fenoles totales fueron evaluados por el método de Folin-Ciocalteu. Para ello se hizo una curva estándar tomando 2, 4, 6, 8 y 10 ml de la solución stock de catecol 10mM y aforando cada una a 100 ml con agua bidestilada. En cinco tubos de ensaye se mezclaron 1 ml de las soluciones preparadas con 1 ml de ácido tricloroacético al 10%, teniendo así cinco nuevas soluciones; de cada una se tomaron 0.75 ml y se pusieron en otros tubos para agregarles 1.5 ml de carbonato de sodio 1.4 M, se agitaron y se les añadió 0.45 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu. La reacción se completó después de dos horas a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 650 nm en el espectrómetro con agua bidestilada como blanco.

El contenido total de fenoles se realizó colocando 0.75 ml de la solución del extracto con 1.5 ml de carbonato de sodio 1.4 M en un tubo de ensaye, se agitó y se le agregó 0.45 ml reactivo de Folin-Ciocalteu, se dejo reaccionar por dos horas; por último, al igual que en la curva, se hizo la lectura de la absorbancia a 650 nm. Todas las mediciones, tanto de la curva como de la prueba, fueron realizadas por triplicado. (García, 2006)

5.2.5. Análisis Estadístico

El análisis es mediante el paquete estadístico Minitab 15. Para la evaluación del aceite utilizar "Análisis de regresión lineal" y "Análisis de Varianza (ANOVA)". En las pruebas de determinación de la capacidad antioxidante y concentración de fenoles totales emplear un "Diseño de Experimentos (DOE)" tipo factorial.