6. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.I. Extracción del Aceite Esencial

La extracción del aceite esencial de romero mediante la técnica de destilación por arrastre de vapor resulto ser efectiva, las primeras gotas de aceite comenzaron a salir entre los 20 y 30 minutos e inmediatamente se dio la separación de fases.

El tiempo de destilación se determinó durante los primero experimentos observando que inicialmente se obtenía el mayor volumen de aceite y entre las dos y tres horas llegaba a su límite, por lo tanto, se estandarizó el método especificando un tiempo de tres horas para todas las replicas realizadas, lo cual concuerda con Durling et al (2006), quien sugiere que el tiempo de extracción para los aceites esenciales no sea mayor de tres horas.

La destilación se llevo a cabo a una temperatura constante de 95°C para el agua en ebullición, mientras que los vapores obtenidos se mantuvieron a 92°C. La temperatura del agua de enfriamiento máxima fue de 6°C.

Para determinar la cantidad óptima de muestra se hicieron varios ensayos a 4 diferentes cantidades: 25, 50, 75 y 100g. Para las muestras de 50, 75 y 100g se hicieron cinco repeticiones, mientras que para 25g se hicieron únicamente tres debido a que el aceite obtenido no era representativo. En la tabla 6.1 se presenta el rendimiento promedio junto con la desviación estándar que se obtuvo para cada muestra de romero. Los resultados de la experimentación se presentan a detalle en el Apéndice A.

Muestra	Rendimiento		
(g)	(ml/100g)		
100	1.83 ± 0.05		
75	1.74 ± 0.11		
50	1.34 ± 0.24		
25	0.48 ± 0.49		

Tabla 6.1. Rendimientos promedio para cada muestra.

Los resultados obtenidos concuerdan con la literatura, ya que los rendimientos de extracción para aceites esenciales varían del 0.5 al 2% (Pérez, 2006), por lo tanto los rendimientos obtenidos se encuentran muy cercanos al límite superior esperado; Santacruz (2006) reporta que utilizando la misma metodología el rendimiento para el aceite del té de limón, laurel y cilantro es menor a 0.86%. Un estudio con romero realizado por Martinello et al (2005) indica que con extracción por solvente se obtuvo un rendimiento promedio de 15.5% (σ = 1.2%) y con destilación por arrastre de vapor su resultado fue de 1.3% (σ = 0.4%). Asimismo, Cerpa (2007) menciona que mediante la técnica de hidrodestilación se obtuvo un rendimiento de 1.35 \pm 0.104% g/g, en base húmeda (22.5% g/g H₂O) utilizando las flores y hojas del Romero español. Otro estudio a nivel piloto hecho por Mateus et al (2006) mediante destilación por arrastre de vapor probando diferentes condiciones de vapor y de empaque, revela que obtuvo un rendimiento promedio de 0.66 \pm 0.12. Con ello se comprueba una vez más que el proceso y las condiciones de operación implementadas en esta metodología arroja resultados superiores a los reportados en la literatura con destilación por arrastre de vapor.

Con los datos presentados en la tabla 6.I es notorio que la cantidad de masa empleada para la destilación es un factor decisivo en la obtención del aceite y en su rendimiento, como era de esperarse hay efecto significativo en la masa utilizada (P=0) y a mayor cantidad de muestra, mayor rendimiento. La prueba de Tukey del análisis de varianza presentado en el Apéndice B indica también que el rendimiento obtenido con 25g es significativamente diferente a las

otras muestras, mientras que el rendimiento entre las otras tres no es significativamente diferente.

En la figura 6.I se observa como varia el rendimiento en cada experimento para los diferentes tamaños de muestra utilizados, para la muestra de 25g se obtiene un rendimiento muy bajo y sobre todo, los datos están muy dispersos ($\sigma = 0.49$), lo cual nos indica que utilizando esa cantidad de muestra los resultados obtenidos serían poco reproducibles. Para 50g se obtuvo un rendimiento mayor y una menor dispersión ($\sigma = 0.24$), sin embargo una desviación de esa magnitud en este caso sigue siendo considerable. Con 75 y 100g el volumen obtenido de aceite se eleva y sobre todo se mantiene con una desviación aceptable (0.11 y 0.05 respectivamente), en la gráfica se observa que las líneas para estas cantidades están relativamente cercanas y se cruzan en algunos puntos, por lo tanto la cantidad óptima de muestra está entre los 75 y los 100g, la elección final va a depender del volumen de aceite que se quiera utilizar, para efectos de esta investigación no eran necesarias grandes cantidades de aceite, por lo tanto se considera que la cantidad de romero más conveniente es de 75g.

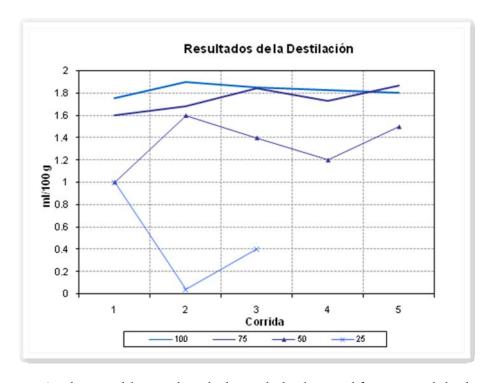


Figura 6.1. Rendimiento del aceite obtenido durante la destilación a diferentes cantidades de romero.

En la figura anterior se observa que algunos datos se encuentran alejados de la tendencia, para corroborarlo se hizo un análisis de regresión (s=0.35) el cuál arrojo nuevamente que el factor masa es muy significativo y que si es posible utilizar un modelo de regresión (P=0), sin embargo el porcentaje de variación es bajo (59.1 %) indicando así que el ajuste del modelo para el proceso no es el mejor (Apéndice B), los datos obtenidos no presentan un comportamiento lineal, como puede verse en las gráficas residuales de la figura siguiente, en la primer gráfica se observa que dos puntos se encuentran muy alejados de la línea, del mismo modo sucede en la siguiente gráfica donde se presenta una tendencia, lo cual implica la presencia de variables ocultas que deben ser analizadas a detalle para mejorar el diseño del experimento, en las últimas dos gráficas se corrobora esta declaración mostrándose espacio entre las dos barras extremas en el histograma y un comportamiento secuencial en la última gráfica.

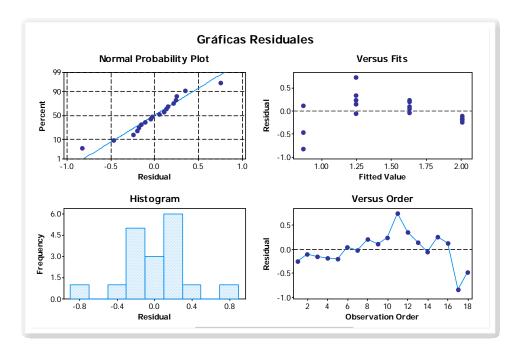


Figura 6.2. Gráficas residuales para el análisis del factor masa.

6.2 Propiedades Físicas del Aceite

El aceite obtenido resultó ser inicialmente un líquido transparente y a lo largo de la destilación fue adquiriendo una tonalidad ligeramente amarillenta, lo cual concuerda con lo reportado por Cerpa (2007), quien lo describe como "líquido incoloro o de color amarillo pálido con un fuerte aroma fresco, alcanforado o mentolado herbáceo y una nota baja a madera balsámica".

El índice de refracción es una propiedad utilizada para controlar la pureza y calidad de los aceites tanto a nivel laboratorio como industrial (Pérez, 2006), para el romero el índice de refracción reportado varía de I.466 a I.472 según el lugar de origen (Costa-Batllori, 2003). El romero utilizado en la presente investigación registró un valor de I.4698, el cual se encuentra exactamente en la media de los valores de la literatura.

La densidad de los aceites varía entre 0.84 y 1.18 dependiendo de la especie y del lugar de origen, según Costa-Batllori (2003), el romero tiene una densidad de entre 0.894 y 0.92. El resultado obtenido en el aceite de estudio fue de 0.8813 ± 0.0037 g/ml, las diferencias entre el valor resultante y el de la literatura muy probablemente se deba a diferencias en el origen de la planta, puesto que el romero utilizado para esta investigación fue cosechado en Puebla, mientras que el rango reportado es para países de Europa y África.

6.3. Determinación de Actividad Antioxidante

En la tabla 6.2 se presenta el promedio en forma de porcentaje de la capacidad antioxidante que tuvieron las soluciones de aceite de romero (a diferentes concentraciones) para inhibir a los radicales libres de DPPH.

Fecha de	Concentración	Concentración de la Solución				
extracción	del Aceite (µl)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
6 meses	900	7.01% ± 17.21%	21.86% ± 4.75%	21.72% ± 8.71%	29.19% ± 4.91%	44.80% ± 4.60%
	350	12.53% ± 15.64%	17.79% ± 6.63%	17.51% ± 8.45%	29.81% ± 8.94%	31.81% ± 2.80%
	10	2.59% ± 3.81%	7.77%	11.91%	23.83% ± 6.01%	5.28%
3 meses	900	II.08% ± I8.47%	7.04% ± 1.61%	12.02% ± 0.15%	16.47% ± 6.45%	25.80% ± 1.76%
	350	16.37% ± 6.60%	8.60% ± 0.88%	21.65% ± 5.86%	19.58% ± 2.64%	19.69% ± 1.32%
Fresco	900	33.68%	37.41%	43.00%	46.94%	58.34%
	350	27.15%	30.26%	30.36%	35.64%	45.08%
	10	27.04%	25.80%	28.70%	35.13%	37.41%

Tabla 6.2. Porcentajes de inhibición obtenidos a diferente tiempo y concentración.

Con los resultados obtenidos se obtuvieron tres gráficas para observar el comportamiento individual que tiene la concentración del aceite según el tiempo transcurrido antes de su análisis. En la figura 6.3 se observa que para el aceite que fue extraído hace seis meses la concentración entre 350 y 900 µl no es muy determinante en el porcentaje de inhibición, si bien se observa que en la concentración de 0.5 ml de solución el porcentaje para 900 µl se eleva considerablemente (44.8 %), también se observa que para la concentración menor (0.1) el porcentaje de inhibición de 350 es mayor al de 900 µl. Sin embargo, regresando a la tabla 6.2 también se puede observar que la desviación que tienen los datos para el aceite más antiguo es muy grande, lo que provoca que los valores muy altos se contrarresten con los más bajos.

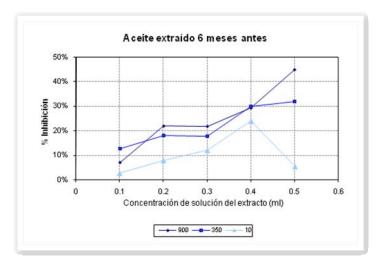


Figura 6.3. Capacidad antioxidante del aceite de romero extraído seis meses antes de su análisis a diferentes concentraciones.

Para el aceite que se extrajo con 3 meses antes se obtuvo un comportamiento diferente al esperado, ya que para tres de las concentraciones el porcentaje de inhibición fue mayor utilizando 350 µl de aceite, sin embargo en la tabla 6.2, también se puede observar que si bien las desviaciones no son tan grandes como para la muestra de 6 meses, siguen siendo considerables, lo que conlleva a tener resultados poco reproducibles y por ende no tan reales en las pruebas realizadas.

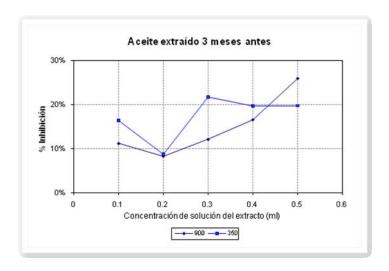


Figura 6.4. Capacidad antioxidante del aceite de romero extraído tres meses antes de su análisis a diferentes concentraciones.

Para la prueba con aceite recién extraído se observa un comportamiento más uniforme y con una tendencia creciente, como se esperaba, es decir, a mayor concentración, mayor porcentaje de inhibición.

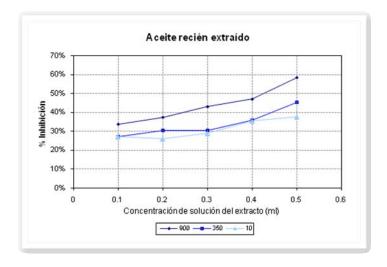


Figura 6.5. Capacidad antioxidante del aceite de romero recién extraído a diferentes concentraciones.

Los resultados estadísticos revelan que en general hay evidencia significativa (P=0) para decir que la concentración de la solución y el tiempo son factores que influyen en el porcentaje de actividad antioxidante del romero, a diferencia de la concentración del aceite, donde no hay diferencia significativa (P=0.247).

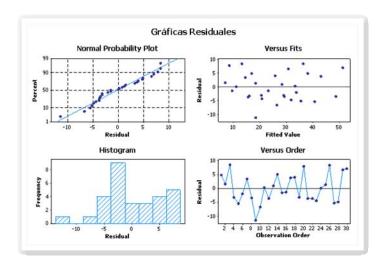


Figura 6.6. Gráficas residuales para la prueba de DPPH.

Las gráficas residuales mostraron una buena distribución ya que se tomaron en cuenta todas las condiciones y por lo tanto no hay patrones que afecten los resultados, es importante mencionar que este análisis se hizo en base a los promedios obtenidos, por lo tanto el error de los resultados estaría basado en las desviaciones a dicho promedio.

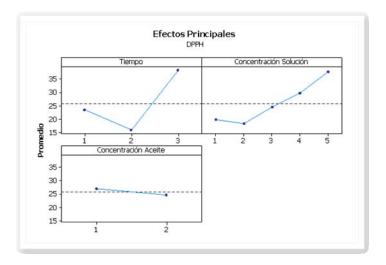


Figura 6.7. Gráficas de efectos principales en el análisis.

Las gráficas de efectos principales concuerdan con el análisis anterior al indicar que la concentración del aceite para esta prueba no es un factor determinante, mientras que la concentración de la solución y el tiempo si lo son.

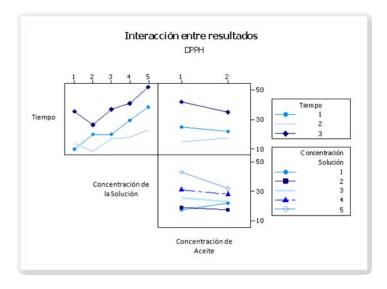


Figura 6.8. Gráficas de interacción entre los factores de la prueba.

A partir de la gráfica de interacción, se puede observar que mientras menor sea la concentración, mayor es la interacción que existe entre el tiempo y la concentración de la solución. El aceite recién extraído es muy afectado por la concentración, mientras que el de tres y seis meses muestra mayores irregularidades ante dicho factor, este fenómeno puede deberse a la falta de homogeneidad en el aceite antiguo, al pasar el tiempo su capacidad antioxidante se va perdiendo gradualmente provocando así que con una pequeña variación en la concentración de la solución (0.1 ml) no se presenten diferencias significativas. Sin embargo, la concentración del aceite con respecto al tiempo si demuestran ligeras diferencias. A partir del análisis realizado se puede decir que cuando pasa el tiempo el aceite se vuelve muy inestable y no es necesario tomar diferente concentración de solución puesto que hay interacciones significativas, es decir, puede tomarse 0.1 en vez de 0.5 ml de solución y se obtendrán resultados similares.

El mayor porcentaje de inhibición resulto de 58.34 y se obtuvo con el aceite recién extraído a la mayor concentración. Montalvo (2006) empleo la misma prueba para determinación de capacidad antioxidante de extractos acuosos y alcohólicos de huazontle, guaje y pápalo, obteniendo una gran diferencia entre los extractos acuosos (de 0 a 43% de inhibición) y los alcohólicos (de 33 a 99% de inhibición).

Un estudio realizado para romero por Peng et al (2007) con extracción supercrítica reporta un porcentaje de capacidad antioxidante en base a la concentración y a las condiciones de extracción, para muestras de 0.0001 mg/ml a 1.00 mg/ml el porcentaje varía de 13.12 a 98.20 respectivamente; igualmente, comparan los resultados obtenidos con sus diferentes condiciones de experimentación con antioxidantes conocidos como lo son Trolox, ácido ascórbico y BHT, obteniendo que el porcentaje del romero es considerablemente mayor que en comparación con trolox y ácido ascórbico, mientras que con BHT los valores obtenidos son muy similares. Según Muchuweti et al (2007) el romero presenta un 88.5% de actividad antioxidante, con lo que concluye que el romero es una de las especies con mayor porcentaje de actividad antioxidante.

Los resultados arrojan que la determinación de la capacidad depuradora del radical DPPH es una prueba sumamente sensible y sus resultados varían mucho dependiendo del método de extracción y específicamente del solvente utilizado.

6.4. Determinación del Contenido de Fenoles Totales

El contenido total de fenoles en el romero se expresa como los miligramos equivalentes de catecol por kilogramo de muestra, para lo cual se hizo una curva de calibración con catecol y se obtuvo la ecuación de la regresión lineal:

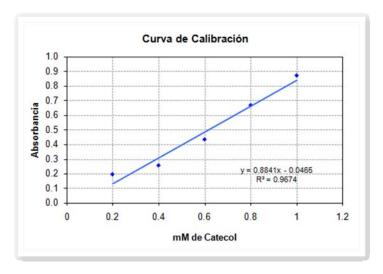


Figura 6.9. Curva estándar de catecol.

A partir de la ecuación se obtuvo el contenido total de fenoles mostrado en la siguiente tabla:

Fecha de extracción	Concentración del Aceite (µl)	Experimento I	Experimento 2	Experimento 3
6 meses	900	444	391	42 I
	350	1125	1052	1160
3 meses	900	1593	970	1284
	350	643	513	395
Fresco	900	1982	2188	1976
	350	I428	I266	1391

Tabla 6.3. Resultados obtenidos para la concentración de fenoles totales.

Puede observarse que la concentración de fenoles es afectada por el tiempo y la concentración del aceite. El contenido total de fenoles en el romero es superior al que presenta la hoja del pápalo que contiene 126.01 mg/kg (Montalvo, 2006), la manzana que contiene entre 100 y 106 mg/kg y la zanahoria con 108 mg/kg (Mattila et al, 2002).

La mayor concentración de fenoles obtenida fue de 2188 mg/kg, de manera que al compararla con frutas consideradas como excelentes fuentes antioxidantes como la frambuesa, zarzamora, fresas y arándanos cuyo contenido va de los 1406 a 8885 mg/kg, se podría decir que el romero no está muy alejado de ellas. Asimismo, puede compararse con el contenido fenólico de diferentes variedades de chile que va desde 1100 a 4142 mg/kg. (García, 2006)

Monroy et al (2007) reporta un estudio para el romero con mezclas etanol-agua a diferentes proporciones, a partir de ello para una mezcla acuosa obtuvo una concentración de fenoles de 371.5, mientras que en una proporción 50:50 etanol-agua fue de 835.5, empleando únicamente etanol la concentración resultante fue de 680. A partir de dicho análisis puede suponerse que el romero contiene compuestos orgánicos más solubles al etanol que al agua los cuales son sensibles al reactivo de Folin-Ciocalteu, provocando así una diferencia en la cantidad de fenoles extraídos.

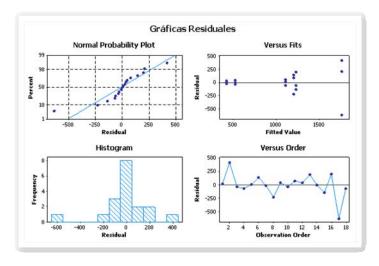


Figura 6.10. Gráficas Residuales para determinación de fenoles totales.

Con las gráficas residuales es notable que existen patrones que no están permitiendo un diseño óptimo del experimento, se ve que hay puntos que se desvían mucho convirtiéndose en puntos extremos; los resultados no se encuentran tan dispersos como deberían, lo cual denota nuevamente que no siguen un comportamiento normal, el histograma presenta barras muy alejadas y gran distancia al centro, existen algunos datos que están haciendo que la prueba en general no tenga el comportamiento esperado, por lo tanto, es aconsejable estudiar específicamente esos valores que se salen del patrón para poder identificar los posibles errores en el método implementado.

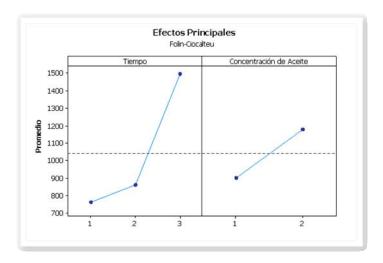


Figura 6.II. Gráfica de los efectos principales que afectan la concentración de fenoles.

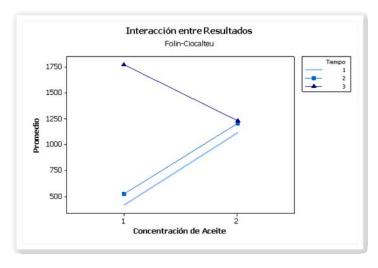


Figura 6.12. Gráfica de interacción entre los factores que influyen en los fenoles totales.

A partir de la gráfica de efectos principales, se puede observar que tanto el tiempo como la concentración afectan fuertemente en la cantidad de fenoles detectados. Con la gráfica de interacción se observa como la muestra extraída tres meses antes presenta un contenido mayor de fenoles al aceite extraído seis meses antes, por lo tanto hay diferencia significativa (P=0.001) entre el tiempo y la concentración de fenoles totales. Sin embargo, en ambos casos se observa un comportamiento diferente al esperado, existe un efecto inverso en cuanto a la concentración, indicando que la mayor cantidad de fenoles la posee la solución menos concentrada (350 µl). Este resultado puede deberse inicialmente a la degradación que sufre el aceite a lo largo del tiempo y principalmente a la falta de homogeneidad en la solución de 900 µl, al igual que para la prueba del DPPH, al ser una mezcla aceite-agua, mientras mayor es la concentración del aceite, menor será la homogeneidad de la solución. La prueba realizada al aceite recién extraído arrojo una concentración muy grande de fenoles totales, sin embargo, es importante tomar en cuenta las desviaciones en los resultados y nuevamente la solubilidad de la solución.