

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales

Tesis Doctoral



Poder antioxidante de concentrados por destilación
molecular de aceite esencial de romero

Autora: Ing. Qca. Gabriela Natalia Mezza

Directora: Dra. Ing. María del Carmen Pramparo

Marzo de 2015

Poder antioxidante de concentrados por destilación molecular de aceite esencial de romero

por

Ing. Qca. Gabriela Natalia Mezza

Dra. Ing. María del Carmen Pramparo

Directora

Comisión Asesora de Tesis

Dra. María del Carmen Pramparo

Dra. Valeria Nepote

Dr. Julio Zygado

Tribunal Examinador de Tesis

Dra. Mónica Nazareno

Dra. María Elena Iriarte

Dr. Carlos Alberto Guzmán

Esta Tesis fue enviada a la Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba para cumplimentar los requerimientos de obtención del grado académico de Doctora en Ciencias de la Ingeniería.

Córdoba, Argentina

Marzo de 2015

Dedicada a...

Mi marido, mi pequeña familia, por acompañarme y apoyarme con paciencia, amor y ternura incondicionales, por tantos años y momentos compartidos y por tantos otros que compartir en esta vida que elegimos transitar juntos de la mano.

Mis papás por guiarme y enseñarme con el ejemplo, que el esfuerzo y la dedicación siempre tienen sus frutos, por su amor y aliento constantes.

Mis hermanas y hermano, compañeros de la vida, por todos los momentos compartidos y por los que tuvimos que rescindir por obligaciones, pero siempre acompañándonos, apoyándonos y queriéndonos.

Mi gran familia por compartir tantos domingos y momentos especiales y estar siempre presentes.

Mis amigas porque los amigos son una parte imprescindible en la vida de toda persona y en la mía, son especialmente únicas.

Agradecimientos

El trabajo realizado en esta tesis fue posible gracias a las becas y subsidios otorgados por CONICET y la Secretaria de Ciencia y Técnica de la Provincia de Córdoba.

Agradezco a la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Río Cuarto y especialmente al grupo de Simulación Aplicada a Procesos (Simap) y al Departamento de Tecnología Química de la Universidad de Río Cuarto por brindarme la oportunidad, el lugar y la confianza para la realización de este trabajo.

Agradezco muy especialmente a mi Directora Dra. María del Carmen Pramparo por pensar y confiar en mí para este trabajo, por alentarme en todo momento transmitiéndome sus conocimientos y experiencias y, especialmente, por brindarme su cariño y acompañamiento constante.

Agradezco a la Dra. María Fernanda Gayol, por sus conocimientos compartidos y por el optimismo y la confianza que me ha transmitido en todo momento.

Agradezco a la Dra. Valeria Nepote y al Dr. Julio Zygadlo por sus aportes y su orientación.

Agradezco a la Ing. Alejandra Tita, secretaria del Doctorado en Ciencias de la Ingeniería, por su eficiencia y amabilidad durante mi trayecto como alumna del mismo.

Agradezco a mis compañeras Ana Borgarello y Julia Berti por su amistad y tantas vivencias compartidas.

Agradezco a Jorge Daghero, Carlos Renaudo y Pablo Rossi por su generosidad y sus aportes en equipamiento y conocimientos completamente desinteresados.

Agradezco al Ing. J. M. Pedroni por su predisposición y generosidad al compartir sus conocimientos.

Agradezco al Dr. Arnaldo Teseo Soltermann y al Dr. José Mariolli, por compartir su equipamiento en forma desinteresada.

Resumen

En el marco de este trabajo se obtuvieron fracciones concentradas en potencial antioxidante a partir de aceite esencial de romero utilizando la operación de destilación molecular.

En esta tesis se detallan las actividades realizadas para diseñar, construir y poner en marcha un prototipo de destilación molecular, investigándose las principales variables del proceso.

Se presenta la caracterización de las fracciones de acuerdo a su composición, capacidad antioxidante y análisis de la estabilidad oxidativa de muestras de aceite de girasol enriquecidas con estas fracciones.

Con el proceso de destilación molecular se logró un incremento de tres y cuatro veces el contenido de *cis*-sabineno hidrato y α -terpineol, respectivamente, en las fracciones residuales. Los residuos tuvieron mayor capacidad antioxidante que los destilados y el aceite esencial de romero, además mostraron mejores valores de índices de peróxidos, dienos conjugados y trienos conjugados que el aceite esencial de romero cuando se utilizaron en muestras de aceite de girasol.

Se muestra el modelado de la destilación molecular de aceite esencial de romero utilizando redes neuronales artificiales. Se creó y entrenó una red capaz de reproducir los datos obtenidos en las operaciones de destilación molecular y con la misma se logró predecir el comportamiento de la operación de destilación molecular.

Abstract

In the context of this work, fractions with high antioxidant potential of rosemary essential oil were obtained using molecular distillation operation.

In this thesis, the activities and steps followed to design, build and implement a molecular distillation prototype are shown and main process variables were investigated.

Characterizations of fractions according to their composition were submitted and antioxidant activity and oxidative stability of sunflower oil samples supplemented with these fractions were presented.

Molecular distillation process achieved an increase of three and four times the content of cis-sabinene hydrate and α -terpineol in the residual fractions, respectively. Residues had higher antioxidant activity than distillates and rosemary essential oil. Residues had the largest capacity to capture free radicals. Residues showed better Peroxide Value, Conjugated Dienes and Conjugated Trienes than rosemary essential oil when they were used in sunflower oil samples.

Molecular distillation modeling from rosemary essential oil using artificial neural networks is shown. Network capable of reproducing data from molecular distillation operations was created and trained. By applying artificial neural networks was possible to predict molecular distillation operation behaviour.

Resumo

No contexto deste trabalho foram obtidas frações concentradas no potencial antioxidante partindo do óleo essencial de alecrim usando destilação molecular.

Nesta tese são detalhadas as atividades executadas para projetar, construir e colocar em operação um protótipo de destilação molecular, investigando as principais variáveis do processo.

É mostrada a caracterização das frações de acordo com a sua composição, o seu poder antioxidante e a sua análise da estabilidade oxidativa das amostras do óleo de girassol enriquecidas com estas frações.

Com o processo de destilação molecular foi conseguido um aumento de três a quatro vezes o conteúdo de hidrato de cis-sabineno e α -terpineol, respectivamente, nas frações residuais. Os resíduos apresentaram maior capacidade antioxidante do que os destilados e o óleo essencial de alecrim. Também apresentaram melhores valores do índice de peróxido, trienos conjugados e dienos conjugados que quando as amostras de óleo essencial de alecrim foram usadas em óleo de girassol.

É apresentada a modelagem da operação de destilação molecular de óleo essencial de alecrim utilizando redes neurais artificiais. Foi criada e treinada uma rede capaz de reproduzir dados das operações de destilação molecular e com a mesma foi possível prever o comportamento da destilação molecular através da aplicação.

ÍNDICE

	Pág.
Resumen	v
Abstract	vii
Resumo	ix
Índice	xi
Índice de Tablas	xv
Índice de Figuras	xvii
Capítulo 1: Introducción	1
1.1 Plantas aromáticas.....	1
1.1.1 Clasificación de las plantas aromáticas.....	3
1.1.2 Aceites esenciales.....	4
1.1.3 Oleorresinas de plantas aromáticas.....	8
1.2 Planta de romero.....	9
1.2.1 Extractos de romero.....	10
1.2.2 Usos de la planta de romero.....	16
1.3 Propiedades antioxidantes.....	19
1.3.1 Rancidez oxidativa.....	19
1.3.2 Antioxidantes.....	20
1.3.3 Determinación cuantitativa de la rancidez oxidativa.....	22
1.3.4 Evaluación de la capacidad de captación del radical libre DPPH [•]	23
1.3.5 Propiedad antioxidante de la oleorresina de romero.....	23

1.3.6	Propiedad antioxidante del aceite esencial de romero.....	24
1.4	Destilación molecular.....	25
1.5	Hipótesis.....	28
1.6	Objetivos.....	28
Capítulo 2: Obtención de aceite esencial de romero por hidrodestilación		31
2.1	Introducción.....	31
2.1.1	Obtención del aceite esencial de romero.....	31
2.1.2	Perfiles cromatográficos del aceite esencial de romero.....	34
2.2	Objetivos.....	35
2.3	Materiales y métodos.....	40
2.3.1	Materia prima.....	40
2.3.2	Operación de hidrodestilación.....	40
2.3.3	Análisis cromatográfico.....	42
2.3.4	Análisis estadístico.....	42
2.4	Resultados y discusión.....	43
2.4.1	Análisis de la operación de hidrodestilación.....	43
2.4.2	Análisis cromatográfico del aceite esencial de romero.....	44
2.5	Conclusiones.....	45
Capítulo 3: Prototipo de destilación molecular. Ensayos preliminares		47
3.1	Ensamblaje y puesta a punto del destilador molecular.....	47
3.1.1	Introducción.....	47
3.1.2	Características del destilador molecular <i>KDL4-UIC</i> utilizado para validar el simulador.....	48
3.1.3	Características del destilador molecular prototipo.....	50
3.1.4	Principales condiciones operativas y requerimientos de servicios.....	51
3.1.5	Componentes del equipamiento prototipo del destilador molecular.....	52
3.1.6	Pruebas post-montaje del equipo prototipo.....	60
3.2	Procedimiento experimental para la realización de ensayos en el prototipo	67
3.3	Ensayos preliminares de destilación molecular para la obtención de fracciones de aceite esencial de romero.....	68
3.3.1	Objetivo.....	68

3.3.2	Materiales y métodos.....	69
3.3.3	Resultados.....	72
3.4	Conclusiones.....	83
Capítulo 4: Obtención de fracciones concentradas por destilación molecular		85
4.1	Introducción.....	85
4.2	Objetivo.....	86
4.3	Materiales y métodos.....	87
4.3.1	Materia prima.....	87
4.3.2	Metodología de operación de destilación molecular.....	87
4.3.3	Composición de extractos concentrados.....	87
4.3.4	Actividad secuestrante de radicales libres mediante el radical DPPH [•]	88
4.3.5	Análisis estadístico de resultados.....	88
4.4	Resultados y discusión.....	90
4.4.1	Resultados de los ensayos de destilación molecular.....	90
4.4.2	Resultados de la composición de extractos concentrados.....	90
4.4.3	Análisis de las concentraciones de extractos concentrados.....	95
4.4.4	Actividad secuestrante de radicales libres mediante el radical DPPH [•]	100
4.4.5	Análisis de componentes principales.....	101
4.5	Conclusiones.....	104
Capítulo 5: Estudio de estabilidad oxidativa del aceite esencial de romero y las fracciones obtenidas por destilación molecular		105
5.1	Introducción.....	105
5.2	Objetivo.....	108
5.3	Materiales y métodos.....	108
5.3.1	Materiales.....	108
5.3.2	Metodología.....	109
5.4	Resultados y discusión.....	111
5.4.1	Test de estabilidad oxidativa.....	111
5.5	Conclusiones.....	119
Capítulo 6: Modelado de la destilación molecular mediante Redes		121

Neuronales Artificiales

6.1	Introducción teórica.....	121
6.1.1	Conceptos básicos de las redes neuronales.....	123
6.1.2	Similitudes con las redes neuronales biológicas.....	125
6.1.3	Características de las redes neuronales.....	126
6.1.4	Red neuronal Backpropagation.....	135
6.2	Consideraciones de configuración.....	142
6.2.1	Selección del valor inicial de los bias y los pesos.....	142
6.2.2	Selección del tamaño del set de entrenamiento.....	142
6.2.3	Número de capas ocultas.....	143
6.2.4	Número de neuronas en la capa oculta.....	143
6.3	Estado del arte: empleo de redes neuronales en el modelado de procesos químicos.....	144
6.4	Objetivo.....	146
6.5	Materiales y métodos.....	146
6.6	Resultados y discusión.....	150
6.6.1	Especificaciones de la red neuronal artificial creada.....	153
6.6.2	Relación entre datos de entrada y salida.....	157
6.7	Conclusiones.....	161
	Capítulo 7: Conclusiones finales	163
	Nomenclatura	167
	Referencias	171
	Anexo I	181
	Anexo II	189
	Divulgación de resultados	201

Índice de Tablas

	Pág.
Tabla 1.1: Clasificación de terpenos.....	8
Tabla 1.2: Compuestos más comunes presentes en el aceite esencial de romero...	17
Tabla 2.1: Recopilación de las composiciones del aceite esencial de romero de la bibliografía referida.....	36
Tabla 2.2: Rendimientos (η) de AER en diferentes condiciones de hidrodestilación: peso de romero procesado y caudal de vapor. Materia prima: hojas de romero con una humedad del 5,5 %.....	44
Tabla 2.3: Composición del aceite esencial de romero obtenido por hidrodestilación.....	45
Tabla 3.1: Resultados de ensayos de destilación molecular (Veloc. rotor: 200 rpm, $T_{\text{evap}}=27^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{cond}}=2^{\circ}\text{C}$).....	72
Tabla 3.2: Resultados de análisis cromatográfico a las muestras de destilado (D) y residuo (R) en cada experiencia de destilación molecular (I, II, III y IV).....	73
Tabla 3.3: Rendimientos porcentuales (η) e índices de concentración (IC) de los componentes principales en los destilados (D) y residuos (R) de las diferentes experiencias de destilación molecular (I, II, III y IV).....	76
Tabla 3.4.: Experiencias analizadas para determinar la influencia de condiciones operativas en la operación de destilación molecular (Veloc. rotor: 200 rpm, $T_{\text{evap.}}: 26 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{cond.}}: 2^{\circ}\text{C}$).....	78
Tabla 3.5: Resultados de ensayos de destilación molecular (Veloc. rotor: 200 rpm, $T_{\text{evap.}}: 12^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{cond.}}: 2^{\circ}\text{C}$).....	81
Tabla 3.6.: Composiciones y valores de EC_{50} del aceite esencial de romero y de las muestras obtenidas de la destilación molecular.....	82
Tabla 4.1: Condiciones operativas y porcentajes de destilados y residuos obtenidos por destilación molecular del aceite esencial de romero.....	92

Tabla 4.2: Composición química de las diferentes fracciones de aceite esencial de romero y las diferentes fracciones obtenidas por destilación molecular.....	93
Tabla 4.3: Relaciones entre los compuestos de las fracciones y del aceite esencial de romero.....	96
Tabla 4.4: Medias \pm desvíos estándar de EC ₅₀ del aceite esencial de romero y de las diferentes fracciones obtenidas por destilación molecular: destilados (D) y residuos (R).....	101
Tabla 4.5: Niveles de valores de EC ₅₀ establecidos.....	103
Tabla 5.1: Coeficientes estimados β_0 y β_1 , y R^2 del análisis de regresión lineal simple para las variables IP, DC y TC en función del tiempo de almacenaje de las muestras analizadas.....	116
Tabla 5.2: Vida útil del aceite de girasol con el agregado de las distintas muestras.....	117
Tabla 6.1: Datos de entrada a la ANN.....	149
Tabla 6.2: Ejes de componentes principales y valores experimentales esperados de %D/F (<i>Sal exp</i>).....	158
Tabla 6.3: Coeficientes R^2 y R^2 ajustado de polinomio no lineal de aproximación con 95% de límites de confianza.....	160
Tabla II.1: Resultados de las ANN estudiadas.....	192

Índice de Figuras

	Pág.
Figura 1.1: Planta de romero.....	9
Figura 1.2: Flor de la planta de romero.....	10
Figura 1.3: Estructura química de los principales compuestos del AER	14
Figura 2.1: Equipo hidrodestilador Figmay.....	41
Figura 2.2: Aceite esencial de romero obtenido en equipo hidrodestilador Figmay.....	42
Figura 3.1: Imagen del equipo de destilación molecular KDL4-UIC.....	49
Figura 3.2: Esquema del equipo de destilación molecular KDL4-UIC.....	50
Figura 3.3: Etapas del montaje del equipamiento prototipo.....	51
Figura 3.4: Esquema del equipamiento prototipo de destilación molecular desarrollado.....	53
Figura 3.5: Cuerpo del destilador molecular y motor del rotor.....	54
Figura 3.6: Balones colectores de destilado y residuo.....	54
Figura 3.7: Alimentador del destilador molecular, con camisa para calefacción con agua y escala graduada.....	55
Figura 3.8: Cuerpo contenedor de resistencia eléctrica para la calefacción por termosifón.....	56
Figura 3.9: Recipiente pulmón de aceite térmico.....	57
Figura 3.10: Medición de la temperatura del residuo con termorresistencia en línea.....	57
Figura 3.11: Trampa fría para la retención de vapores del destilador.....	57

Figura 3.12: Bomba difusora con sensor de presión de alto vacío.....	58
Figura 3.13: Ubicación de la bomba mecánica y de la de aceite térmico, e indicación de nivel de la bomba mecánica.....	59
Figura 3.14: Indicador de presión de alto vacío.....	59
Figura 3.15: Válvula micrométrica para regulación de presión.....	59
Figura 3.16: Imagen superior de la bomba de aceite térmico.....	60
Figura 3.17: Variación de la temperatura del aceite térmico en función del tiempo.....	61
Figura 3.18: Variación de la presión manométrica dentro del tanque de fluido calefactor durante el calentamiento.	61
Figura 3.19: Temperatura del fluido calefactor en función del tiempo para máxima y mínima potencia de la resistencia de calefacción.....	62
Figura 3.20: Pruebas de calentamiento de fluido calefactor realizadas en verano e invierno.....	62
Figura 3.21: Evolución de la presión durante la prueba de vacío.....	63
Figura 3.22: Evolución de la temperatura para diferentes niveles de potencia de la resistencia eléctrica.....	64
Figura 3.23: Comparación de la evolución de la temperatura en diferentes puntos del circuito.....	64
Figura 3.24: Absorbancia de la muestra de aceite esencial de romero en hexano de concentración de 12,9 mg/ml en función del tiempo.....	71
Figura 3.25: Determinación del valor de EC ₅₀	71
Figura 3.26: Composición en % p/p de los diferentes compuestos en cada etapa en función del porcentaje de destilado obtenido para los destilados (D) 3.26 a) y para los residuos (R) 3.26 b).....	74
Figura 3.27: Gráfico de representación de la superficie de ajuste del porcentaje de destilado en función de la presión de operación y del flujo de alimentación y datos experimentales.....	78
Figura 3.28: Esquema de la operación de destilación molecular en serie en 3 etapas.....	80
Figura 4.1: Esquema representativo de la metodología de destilación molecular en serie de 4 etapas.....	89
Figura 4.2: Comparación de cromatogramas de AER y algunas de las fracciones obtenidas.....	91
Figura 4.3: Biplot del análisis de componentes principales de las fracciones obtenidas del proceso de destilación molecular del aceite esencial de romero (AER): residuos (R1, R2, R3 y R4) y destilados: (D1, D2, D3 y D4) y de los distintos niveles de EC ₅₀ para las concentraciones de los diferentes componentes.	102
Figura 5.1: Evolución de los valores de IP de AER, distintas fracciones del mismo y antioxidante BHT sobre una matriz de aceite de girasol mantenido a 23 °C, durante 115 días.....	112

Figura 5.2: Evolución de los valores de DC de AER, distintas fracciones del mismo y antioxidante BHT sobre una matriz de aceite de girasol mantenido a 23 °C, durante 115 días.....	113
Figura 5.3: Evolución de los valores de TC de AER, distintas fracciones del mismo y antioxidante BHT sobre una matriz de aceite de girasol mantenido a 23 °C, durante 115 días.....	114
Figura 6.1: Esquema de una neurona.....	124
Figura 6.2: Conexión entre neuronas.....	124
Figura 6.3: Neurona biológica.....	126
Figura 6.4: Red Neuronal Monocapa.....	129
Figura 6.5: Red Neuronal Multicapa.....	129
Figura 6.6: Función de activación lineal.....	133
Figura 6.7: Función de activación escalón.....	134
Figura 6.8: Función de activación sigmoide binaria.....	134
Figura 6.9: Función de activación sigmoide tangente hiperbólica.....	135
Figura 6.10: Arquitectura de una red multi-capa.....	137
Figura 6.11: Estructura de la ANN.....	151
Figura 6.12: Performance de la ANN.....	152
Figura 6.13: Regresión de la ANN.....	152
Figura 6.14: Resultados del entrenamiento de la ANN.....	154
Figura 6.15: Resultados de validación de la ANN.....	155
Figura 6.16: Valores de %D/F experimentales (<i>Sal exp</i>) en función de CP1 y CP2.....	159
Figura I.1: Composición (%p/p) de los compuestos más volátiles en los destilados.....	182
Figura I.2: Composición (%p/p) de los compuestos menos volátiles en los destilados.....	182
Figura I.3: Rendimiento porcentual (η) de los compuestos más volátiles en los destilados.....	183
Figura I.4: Rendimiento porcentual (η) los compuestos menos volátiles en los destilados.....	183
Figura I.5: Índices de concentración (IC) de los compuestos más volátiles en los destilados.....	184

Figura I.6: Índices de concentración (IC) de los compuestos menos volátiles en los destilados.....	184
Figura I.7: Composición (%p/p) de los compuestos más volátiles en los residuos	185
Figura I.8: Composición (%p/p) de los compuestos menos volátiles en los residuos.....	185
Figura I.9: Rendimiento porcentual (η) de los compuestos más volátiles en los residuos.....	186
Figura I.10: Rendimiento porcentual (η) de los compuestos menos volátiles en los residuos.....	186
Figura I.11: Índices de concentración (IC) de los compuestos más volátiles en los residuos.....	187
Figura I.12: Índices de concentración (IC) de los compuestos menos volátiles en los residuos.....	187

CAPÍTULO 1

Introducción

En este capítulo se presentan las características de las plantas aromáticas y en particular del romero y de los productos que pueden obtenerse a partir de ella, básicamente oleorresina de romero y aceite esencial de romero. Se detallan las características del aceite esencial de romero en general, y en particular sus propiedades antioxidantes. Se introduce sobre las reacciones de rancidez oxidativa, técnicas para cuantificarla y diferentes mecanismos para disminuirla o evitarla. Por último se aborda la operación de destilación molecular, tecnología necesaria para obtener fracciones concentradas en compuestos que evidencien mejoras en la capacidad antioxidante del aceite esencial de romero del cual se parte.

1.1 Plantas aromáticas

La historia de las plantas aromáticas es tan larga como la historia de la humanidad. Las personas han utilizado estas plantas desde los tiempos más remotos. Las plantas aromáticas son valoradas por sus propiedades medicinales y aromáticas repelentes de insectos, entre otras, y con frecuencia se cultivan y cosechan para este propósito únicamente. Es por ello que hierbas y especias tienen una gran importancia como ingredientes en los alimentos para impartir sabor, picante y color. También son utilizadas en bebidas alcohólicas, medicamentos, productos de perfumería, cosméticos,

colorantes y como plantas de jardín. Tienen propiedades antioxidantes, antimicrobianas, farmacéuticas y nutricionales (Peter, 2001).

La utilización de plantas aromáticas en reemplazo de la sal, como condimento, es un hábito que se está promoviendo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda un consumo máximo de sal de 5 g diarios (*World Health Organization*, 2007). Sin embargo, en Argentina, según datos del Ministerio de Salud de la Nación, el consumo de sal por persona oscila entre los 10 y 12 g por día. El consumo excesivo de sal es la principal causa de los problemas de hipertensión de la población. Es por esto, que los consumidores tienden a eliminar la utilización de sal en las comidas, de lo que surge la necesidad de reemplazarla por condimentos y mezclas de plantas aromáticas.

Actualmente, la población prefiere consumir alimentos naturales, por lo que se busca reemplazar a los colorantes, aromas, conservantes y antioxidantes artificiales por productos naturales que confieran estas características. Frente a esta demanda las plantas aromáticas son una alternativa muy importante.

Los antioxidantes son un ingrediente cada vez más importante en la elaboración de alimentos. Tienen la capacidad de inhibir el desarrollo de la rancidez oxidativa de los alimentos basados en grasas, especialmente la carne y los productos lácteos y fritos (Peter, 2001). Los consumidores exigen alimentos con menos aditivos sintéticos, pero mayor seguridad y vida útil.

Las principales plantas aromáticas usadas en productos cárnicos procesados son albahaca, apio, mejorana, orégano, romero y tomillo. Las plantas aromáticas deben cultivarse en climas templados, y para poder utilizarlas se deben secar sus hojas, proceso que puede realizarse al aire libre o en secaderos.

Las plantas aromáticas en Argentina llegan en gran medida a cubrir las necesidades del mercado interno, y en algunos casos se comercializan en el exterior. El Instituto Nacional de Tecnologías Agropecuarias (INTA) informa que la menta, el orégano, el romero, el tomillo y el estragón son especies aromáticas que tienen posibilidades de exportación (Berzins y Romagnoli, 2005).

En Argentina las principales zonas productoras de plantas aromáticas son:

- Mesopotamia: citronella, menta japonesa, esencias de cítricos y resinas de pino.
- Litoral: se destaca la producción de manzanilla, coriandro, mostaza, hinojo dulce y eucaliptus.

- Chaco y Formosa: se producen menta japonesa y limón.
- NOA (Nor-Oeste Argentino): los cultivos tradicionales son: anís, comino, pimiento para pimentón y limón.
- Cuyo: se cultivan con buenos resultados mentas, orégano, lavandín, romero, tomillo, estragón, ajeno, anís e hisopo. Existen plantaciones importantes de especies autóctonas como poleo y jarilla.
- Patagonia: hay experiencias exitosas de producción de orégano, lavanda y lavandín.
- Centro: En Córdoba es de relevancia la producción de orégano, menta, romero, lavandín, salvia, albahaca, melisa (Berzins y Romagnoli, 2005).

1.1.1 Clasificación de las plantas aromáticas

Las plantas aromáticas pueden ser clasificadas de acuerdo a la familia botánica a la que pertenecen, a la duración del cultivo y al hábito de crecimiento (Peter, 2004).

- Clasificación basada en la familia botánica:

Apiáceas: eneldo, apio, hinojo, levístico, perejil, etc.

Lamiáceas: hisopo, menta, albahaca, mejorana, orégano, romero, salvia, tomillo, etc.

Liliáceas: puerro, cebollino, etc.

- Clasificación basada en la duración del cultivo:

Anual: albahaca, cilantro, eneldo, etc.

Bianual: alcaravea, puerro, perejil, etc.

Perennes: salvia, laurel, pimenta, romero, menta, orégano, estragón, tomillo, etc.

- Clasificación basada en el hábito de crecimiento:

Hierbas: alcaravea, cilantro, menta, orégano, mejorana, etc.

Arbustos: romero, salvia, tomillo, etc.

Árboles: pimienta, hojas de curry, laurel, etc.

1.1.2 Aceites esenciales

El aceite esencial (AE) es el extracto obtenido al someter a la planta aromática a una destilación. Las principales condiciones del AE (calidad, cantidad y composición) cambian de acuerdo al clima, composición del suelo, órgano de la planta, edad y etapa del ciclo vegetativo.

Los aceites esenciales (AEs) son altamente concentrados y muy volátiles, se disuelven fácilmente en los aceites vegetales, materias grasas y en alcohol. No se disuelven en agua, pero pueden mantenerse suspendidos en ella durante breves períodos de tiempo. Tienen una gran capacidad de penetración, se absorben fácilmente por la piel sin necesidad de transportadores. Se difunden rápidamente en los tejidos subcutáneos adyacentes y pasan a la circulación sanguínea que los distribuye por todo el organismo (Bakkali y colab., 2008).

A temperatura ambiente, son líquidos poco densos, generalmente presentan una densidad más baja que la del agua pero una mayor viscosidad. Los AEs son producidos al momento de activarse mecanismos de defensa como respuesta a factores ambientales y ecológicos. Son inflamables, no son tóxicos, aunque pueden provocar alergias en personas sensibles a determinados terpenoides (Rodríguez Álvarez y colab., 2012).

Existe una diferenciación entre lo que son los aceites esenciales y las esencias; el término AE se utiliza para los productos obtenidos por destilación y prensado, calificando como esencias los que han sufrido transformaciones o se han obtenido por otros procedimientos. Un AE al que se le elimina la fracción terpénica para mejorar su solubilidad, o por otras causas, se convierte en una esencia desterpenada.

Los AEs son mezclas naturales muy complejas que contienen entre 20 y 60 componentes a muy distintas concentraciones. Están caracterizados por dos o tres componentes principales cuyas concentraciones son relativamente altas (20-70 %) comparados a otros presentes en trazas.

Los componentes incluyen dos grupos de distinto origen biológico. El grupo principal está compuesto de terpenos y terpenoides y el otro grupo por constituyentes aromáticos y alifáticos, todos caracterizados por un bajo peso molecular (Cerpa Chávez, 2007; Bakkali y colab., 2008). La composición de los AEs puede variar considerablemente entre las especies y variedades de las plantas aromáticas y de

acuerdo a las distintas zonas geográficas de producción de las mismas (Gillij y colab., 2008).

Métodos de extracción de aceites esenciales

Los AEs pueden ser obtenidos por distintos métodos de extracción: prensado, extracción con solventes volátiles, *enfleurage*, extracción por fluidos supercríticos y destilación con vapor de agua. A continuación se presenta una breve descripción de estas tecnologías:

a) Prensado: el material vegetal es exprimido mecánicamente a fin de que libere el aceite contenido en él. El aceite es filtrado y recolectado. Este método es utilizado, principalmente, para la extracción de AE proveniente de cítricos.

b) Extracción con solventes volátiles: el material seco y molido se pone en contacto con solventes como alcohol o cloroformo, de modo que el AE es solubilizado por los mismos, pero también se extraen otras sustancias como grasas y ceras, obteniéndose un AE impuro. Esta metodología se utiliza a escala de laboratorio, ya que a nivel industrial resulta costosa por el alto valor comercial de los solventes y por el proceso de purificación necesario de realizar con el fin de obtener AE limpio.

c) *Enfleurage* o método de enflorado: el material vegetal, que generalmente consiste de flores, se pone en contacto con una grasa. El AE es solubilizado en la grasa que actúa como vehículo extractor y se obtiene una mezcla de AE y grasa la cual debe ser separada posteriormente por otros medios físico-químicos. En general se recurre al agregado de alcohol caliente a la mezcla y su posterior enfriamiento para separar la grasa y el extracto aromático. Debido a la difícil separación del aceite extractor y al bajo rendimiento que posee la técnica, su utilización se ve reducida.

d) Extracción con fluidos supercríticos: el material vegetal es cortado en trozos pequeños, licuado o molido, y se hace circular a través de él un fluido en estado supercrítico; un fluido altamente utilizado en esta operación es CO₂. El AE es solubilizado y arrastrado mientras que el fluido supercrítico se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar presión y temperatura ambiente. Este procedimiento presenta como ventajas el alto rendimiento, la fácil eliminación del solvente y la no alteración de las propiedades químicas del AE por las bajas

temperaturas utilizadas para su extracción. Sin embargo el equipo requerido es costoso (Rodríguez Álvarez y colab., 2012).

e) Destilación con vapor de agua: el AE es obtenido a partir del material vegetal por destilación con vapor de agua. Dependiendo de las condiciones del vapor y la ubicación del generador de vapor, existen diferentes nombres para esta operación, los mismos se presentan a continuación:

-Destilación por arrastre de vapor: cuando se usa vapor saturado o sobrecalentado, y el mismo es producido fuera del equipo principal. No existe agua en el fondo del recipiente, sino que el vapor ingresa al recipiente de destilación y es generado por una fuente externa (Cerpa Chávez, 2007; Rodríguez Álvarez y colab., 2012).

-Hidroextracción: cuando se usa vapor saturado, pero la materia no está en contacto con el agua generadora, sino con un reflujo del condensado formado en el interior del destilador (Cerpa Chávez, 2007; Rodríguez Álvarez y colab., 2012).

-Hidrodestilación: cuando se usa vapor saturado. Su presión es superior a la atmosférica, pero el vapor efluente, que extrae al aceite esencial está a la presión atmosférica. La materia prima forma un lecho compacto y se desprecia el reflujo interno de agua debido a la condensación del vapor circundante. La generación del vapor puede ser local (hervidor), remota (caldera) o interna (base del recipiente) y se suministra un flujo constante de vapor. El material se coloca sobre una rejilla perforada ubicada a cierta distancia del fondo del recipiente, en el cual se encuentra agua en ebullición. En este caso, el vapor asciende a través del material vegetal, que debe estar correctamente distribuido para permitir el paso del vapor y la extracción completa de sus componentes volátiles. La corriente de vapor producida asciende e ingresa a un condensador que generalmente se refrigera con agua circulante. Allí el vapor se enfría, condensa y se transforma en un líquido formado por dos fases inmiscibles: una fase orgánica compuesta por el aceite esencial y una fase acuosa. En el caso de algunos aceites, la fase acuosa contiene cierta cantidad de esencia ya que una fracción de sus componentes es soluble en agua. En general el aceite esencial es menos denso y flota sobre la fase acuosa, permitiendo su separación por decantación gravimétrica (Cerpa Chávez, 2007; Sawamura, 2010; Álvarez y colab., 2012).

Componentes de los aceites esenciales

Los AEs están constituidos por moléculas cuya estructura base está formada por una cadena carbonada de entre 7 y 20 átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno. Los compuestos de los AEs más comunes son los monoterpenos que presentan 10 átomos de carbono en su estructura. Las moléculas con menor número de carbono son las más volátiles, pero no hidrosolubles, por lo que quedan en el hidrolato aromático (o agua de destilación); las moléculas que poseen un mayor número de carbonos son poco volátiles y generalmente forman resinas (Romero Márquez, 2004).

Los terpenos son hidrocarburos que surgen como una combinación de unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno). Los terpenoides son terpenos que en su molécula contienen un átomo de oxígeno. Los terpenos principales son los monoterpenos (C_{10}) y sesquiterpenos (C_{15}), pero los hemiterpenos (C_5), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}) y tetraterpenos (C_{40}) también existen. De acuerdo con el número de unidades isoprenicas fusionadas, se constituyen los distintos terpenos. Los monoterpenos son formados a partir de la unión de dos unidades de isoprenos. Monoterpenos y sesquiterpenos son los integrantes más comunes de los aceites esenciales, junto con sus numerosos derivados oxigenados, entre ellos, aldehídos, cetonas, alcoholes, éteres y ésteres, carburos, peróxidos, fenoles, etc. Los monoterpenos son las moléculas más representativas de los aceites esenciales, constituyendo el 90 % de los mismos. En los terpenos se presentan distintas clases de isomería.

Los sesquiterpenos se forman a partir de la unión de tres unidades de isoprenos (C_{15}). La extensión de la cadena aumenta el número de ciclizaciones, lo cual permite una gran variedad de estructuras. Las estructuras y las funciones de los sesquiterpenos son similares a las de los monoterpenos: carburos, alcoholes, cetonas, epóxidos. Los sesquiterpenos no son los compuestos más abundantes en los AE, sin embargo también están presentes; el romero es un ejemplo de las plantas que contienen sesquiterpenos (Bakkali y colab., 2008).

En la Tabla 1.1 se presenta información relativa a la clasificación de los terpenos mencionados.

Tabla 1.1: Clasificación de terpenos

Nombre	Nº de unidades de isopreno	Nº de átomos de carbono
Hemiterpenos	1	5
Monoterpenos	2	10
Sesquiterpenos	3	15
Diterpenos	4	20
Triterpenos	6	30
Tetraterpenos	8	40
Politerpenos	> 8	> 40

Los compuestos aromáticos aparecen en los AEs con menor frecuencia que los terpenos. Los AEs pueden incluir antioxidantes tales como terpenoides y componentes fenólicos. Las propiedades antioxidantes de los aceites esenciales y de los componentes han sido frecuentemente verificados *in vitro* por métodos físico-químicos (Bakkali y colab., 2008).

La presencia de compuestos aromáticos tiene una composición variable en función de diferentes variables: cantidad de horas de luz que recibió la planta, estación del año e inclinación de los rayos solares, naturaleza y fertilidad del suelo, altitud y latitud, si la planta se encuentra más o menos expuesta a los vientos y precipitaciones, entre otras. Por este motivo, plantas que pertenezcan al mismo género y especie y que no presenten diferencias en su aspecto externo, pueden segregar dos aceites esenciales diferentes (Bakkali y colab., 2008).

1.1.3 Oleorresinas de plantas aromáticas

La oleorresina de plantas aromáticas se produce en un equipo *Soxhlet*. Se coloca parte de la planta en un recipiente por donde se recircula un solvente. El solvente recirculado extrae componentes de mucho interés que no son volátiles, por lo que no forman parte de los aceites esenciales. Las variables que pueden modificarse en la producción de oleorresinas de plantas aromáticas son: solventes utilizados (etanol, metanol, hexano, etc.), temperatura del solvente, tiempo de extracción, entre otras.

El producto de interés de este proceso es la mezcla extracto-solvente. El solvente debe ser removido del extracto en un evaporador rotatorio (rotavapor) que trabaja en condiciones de vacío. En el rotavapor el solvente se evapora y el extracto queda libre del mismo, para poder ser utilizado.

1.2 Planta de romero

La palabra romero deriva de la palabra latina “*rosmarinus*”, que significa rocío marino. La planta de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) es un arbusto perenne que pertenece a la familia *Lamiácea*. Es una planta densa, siempre verde, robusta de una altura entre 90 y 200 cm, con hojas pequeñas de 2 a 4 cm, puntiagudas y peludas. Las ramas son rígidas con corteza fisurada y tallo cuadrado, leñoso y marrón. Las hojas son resinosas (Peter, 2004). Posee pequeñas flores azul pálido que aparecen en la época de floración de la planta. Las hojas, las flores y las ramas producen un aceite esencial y una oleorresina valorada en la medicina tradicional, la medicina moderna y la aromaterapia, así como también en las industrias de perfumes y de sabor. En la Figura 1.1 se muestra una imagen de la planta de romero, mientras que en la Figura 1.2 se destaca la flor del romero.



Figura 1.1: Planta de romero



Figura 1.2: Flor de la planta de romero

Existen diferentes especies de romero: *Rosmarinus officinalis*, *Rosmarinus eriocaly*, *Rosmarinus laxiflorus*, *Rosmarinus lavandulaceus*. La especie *R. officinalis* es la única que crece en forma natural en la región del Mediterráneo y es la especie que se ha utilizado en el desarrollo de este trabajo de investigación.

La reproducción de la planta de romero puede hacerse por medio de semillas o mediante esquejes. La cosecha se realiza cuando la planta se halla al comienzo de la floración (Peter, 2004).

Generalmente, las hojas, las flores y los brotes cosechados son usados sin secar para su posterior procesamiento. Sin embargo, las hojas y los tallos pueden también usarse después del secado para la obtención de aceite esencial. El secado natural se efectúa a la sombra y en lugar bien ventilado, guardándose posteriormente en cajas de cartón o bolsas de papel (Peter, 2004).

1.2.1 Extractos de romero

De la planta de romero pueden obtenerse aceite esencial de romero (AER) y oleoresina de romero (OR). Estos dos extractos contienen distintos compuestos activos.

La OR y el AER pueden ser utilizados para estabilizar los aceites y grasas que contienen los alimentos frente a la oxidación, rancidez y a la fermentación de productos cárnicos, manteca, etc. (Pokorny y colab., 2001).

Aceite esencial de romero

El AER generalmente se obtiene a partir de la especie *Rosmarinus officinalis L.*, sin embargo, también puede obtenerse a partir de otras especies. Elamrani y colab. (2000), han utilizado las especies *Rosmarinus officinalis* y *Rosmarinus eriocalyx* para la obtención de aceite esencial de romero en investigaciones realizadas en Marruecos.

El AER es recuperado, generalmente, por destilación con vapor o agua. La mayor parte del aceite (90 %) se obtiene dentro de los primeros 60 minutos de destilación, aunque la destilación puede ser continuada por 120 minutos para la recuperación total del AER. El AER obtenido a partir de las hojas y las flores es de mejor calidad que el aceite que se obtiene a partir de la destilación de toda la planta, que incluyen los tallos de la misma debido a la incorporación de algunos compuestos indeseables presentes en los tallos. Al comparar la destilación con vapor y con agua, se encuentra que la primera es mejor en términos del perfil de rendimiento y de la calidad del aceite obtenido (Peter, 2004).

Aunque el AER es extraído tradicionalmente por destilación con vapor o agua, experimentos con nuevos procesos de extracción están en marcha, tales como la descompresión instantánea controlada (DIC). Rezzoug y colab. (2000) comparan las dos metodologías antes mencionadas para obtener AER. El proceso DIC consiste en exponer las hojas de romero por un breve período de tiempo a la presión de vapor (0,5 a 3 bar) seguido de una descompresión instantánea a vacío (aproximadamente 15 mbar). En el trabajo se concluye que el método DIC es más rápido que el método convencional.

Se ha comparado la técnica de hidrodestilación tradicional y la metodología de hidrodifusión por microondas y gravedad y se evaluó la efectividad de ambos métodos para obtener AE a partir de hojas de romero fresco, especie *Rosmarinus officinalis*. El método de hidrodifusión por microondas ofrece el mismo rendimiento en la producción de AER que con la metodología de hidrodestilación convencional, con la diferencia que

el rendimiento se alcanza en un tiempo mucho menor, 15 minutos comparados con un tiempo de entre 1 y 3 horas para la hidrodestilación, además se utiliza menor cantidad de energía para llevarlo a cabo y no se generan residuos ya que no se utiliza agua o disolvente para su obtención (Bousbia y colab., 2009).

El rendimiento y la composición del AER dependen de muchos factores. Un factor importante que se ha analizado es la época de cosecha de la planta. Se han realizado investigaciones donde comparan la composición y el rendimiento del AER producido en tres distintas épocas de cosecha de la planta (antes de la floración, durante la floración y después de la floración). Encontraron que la etapa de floración de la planta de romero es la más adecuada para obtener un mayor rendimiento en la cantidad de AER producido (Elamrani y colab., 2000; Peter, 2004).

Los métodos de secado de las hojas de romero tienen mucha influencia en los compuestos volátiles residuales que quedan en ellas y que luego serán parte del AER (Szumny y colab., 2010; Peter, 2004). Se ha comparado también el rendimiento y la composición de aceites obtenidos de plantas de distintas partes del mundo (España, Grecia, Portugal, Estados Unidos, Yugoslavia, Hungría y Túnez), y las composiciones de los aceites difieren bastante entre diferentes lugares de cultivo (Boutekedjiret y colab., 1998).

No todos los componentes de un aceite esencial poseen estructuras y/o características similares. Existen entre los componentes del aceite esencial de romero, monoterpenos hidrocarbonados y monoterpenos oxigenados. Los monoterpenos hidrocarbonados tienen menor valor que los compuestos oxigenados en términos de su contribución a la fragancia de los aceites esenciales, ya que los compuestos oxigenados son altamente odoríferos y por lo tanto son los más valiosos como materia prima en la industria cosmética (Bousbia y colab., 2009).

- **Composición del aceite esencial de romero**

Los componentes más comunes presentes en el AER proveniente de *R. officinalis* son: α -pineno; β -pineno; canfeno; mirceno; α -terpineno; limoneno; γ -terpineno; verbenona; alcanfor; 1,8-cineol; *cis*-sabineno hidrato; linalol; terpinen-4.ol; borneol; α -terpineol; geraniol; bornil-acetato; β -cariofileno; β -cariofileno epoxi (Elamrani y colab.,

2000; Flamini y colab., 2002; Szumny y colab., 2010). En la Figura 1.3 se muestra la estructura química de estos compuestos.

Dado que la composición del AER puede variar según el lugar geográfico de recolección de la planta, el clima, la temperatura y la humedad del suelo, la distancia entre las plantaciones, métodos de secado, método de extracción (Flamini y colab., 2002; Socaci y colab., 2007), se propone la clasificación de los mismos en quimiotipos, cuyo nombre corresponde a la denominación del componente mayoritario. De determinaciones experimentales realizadas en varias muestras, tres principales quimiotipos fueron encontrados: α -pineno, alcanfor y 1,8-cineol (Elamrani y colab., 2000; Romero Márquez, 2004; Varela y colab., 2009). También se encuentran AERs ricos en mirceno (25 %) y canfeno; estas variedades se obtienen a partir de las especies de romero cultivadas en países como Portugal, Brasil y Argentina (Varela y colab., 2009).

La composición de los compuestos principales varía entre los siguientes valores: 1,8-cineol (2-60 %), alcanfor (4-40 %), α -pineno (0-40 %), borneol (0-30 %), verbenona (0-20 %), acetato de bornilo (hasta un 15 %) (Elamrani y colab., 2000; Flamini y colab., 2002; Peter, 2004; Szumny y colab., 2010).

Debersac y colab. (2001) reportaron que el principal componente de las hojas secas de *R. officinalis* de Grasse, Francia, fue el monoterpeno óxido 1,8-cineol (36,1 %). Muchos monoterpenos y sesquiterpenos hidrocarbonados estaban presentes en grandes cantidades (32,2 %). Los autores identificaron α -pineno, β -pineno, β -cariofileno, canfeno, limoneno, mirceno y p-cimeno. También detectaron a la cetona monoterpenada, alcanfor (12,8 %) y alcoholes monoterpenados (9,6 %) tal como borneol.

Se ha comparado el AER producido a partir de *R. officinalis* de 3 distintas zonas de Marruecos (Rabat, Elateuf, Taforalt); cada uno de los AER obtenidos pertenece a distintos quimiotipos. El producido a partir de la planta cosechada en la zona de Rabat pertenece al quimiotipo α -pineno, el de Elateuf al 1,8-cineol y el de Taforalt al alcanfor (Elamrani y colab., 2000).

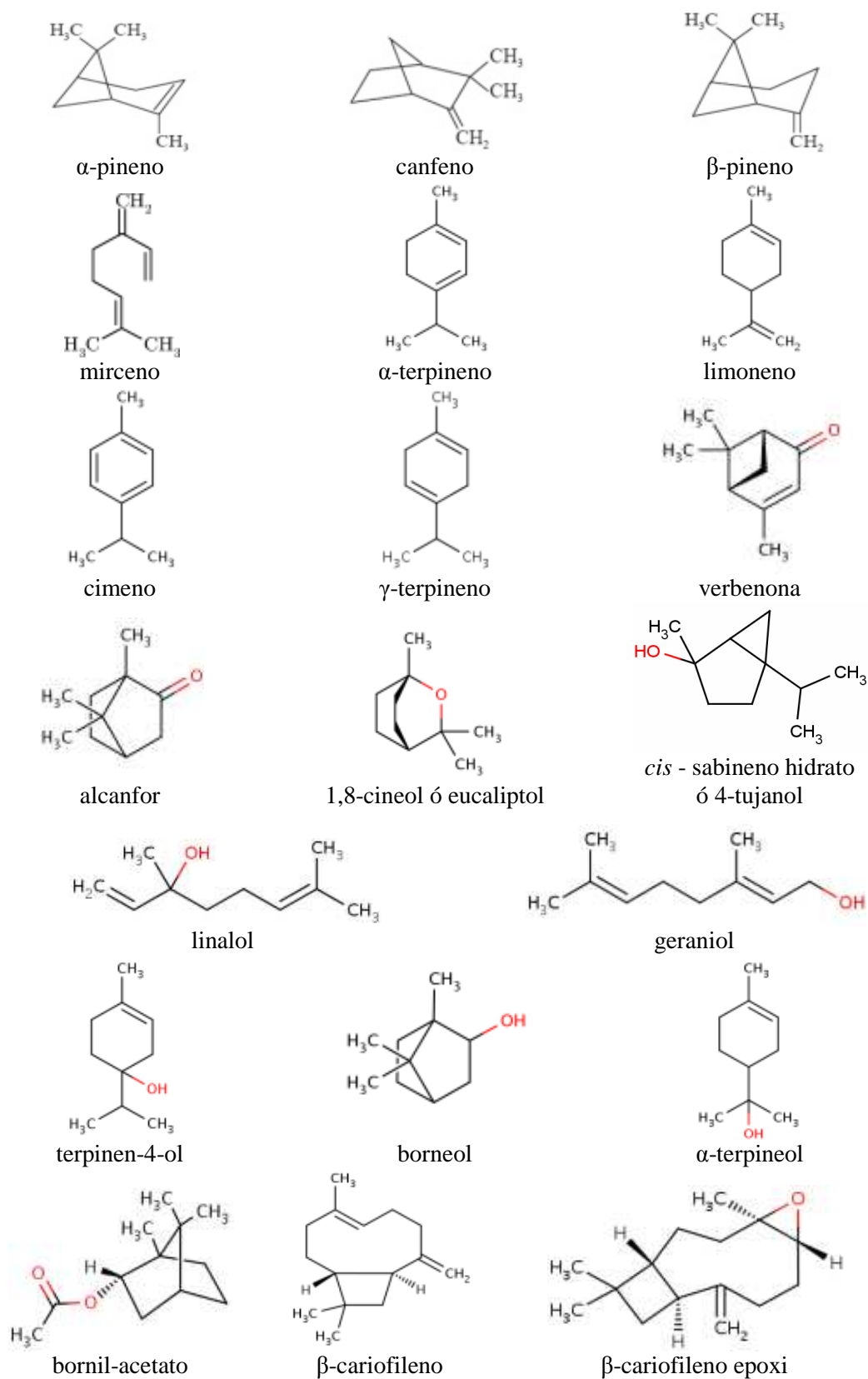


Figura 1.3: Estructura química de los principales componentes del AER

En Marruecos, el 1,8-cineol generalmente tiene un porcentaje más alto que en los sitios tradicionales del sur de Francia o que el que se produce en Argentina. El AER que se obtiene en la isla de Córcega, por ejemplo, contiene 1,8-cineol, pero además se puede hallar muy frecuentemente en la composición un éster, acetato de etilo y las cetonas: verbenona y alcanfor (en mayor proporción que el 1,8-cineol) que le confieren propiedades diferentes (Romero Márquez, 2004).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) junto con la Organización Mundial de la Salud (WHO - *World Health Organization*) crearon un comité mixto en aditivos alimentarios (JECFA- *The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additive*). El JECFA se ha creado en 1956 y ha evaluado la inocuidad de los aditivos alimentarios, entre ellos, agentes aromatizantes, comprendiendo más de 2.500 aditivos alimentarios, alrededor de 40 contaminantes y sustancias tóxicas naturales y los residuos de aproximadamente 90 medicamentos veterinarios. En la Tabla 1.2 se presentan los compuestos más comunes presentes en el AER y características de los mismos proporcionadas por la JECFA. En la misma se muestra: nombre con que generalmente se encuentra el compuesto, peso molecular, fórmula química, solubilidad en etanol y punto de ebullición (°C), determinado a una presión de 760 mmHg. Los compuestos se encuentran en orden creciente respecto al valor de su punto de ebullición.

Oleorresina de romero

La OR ha sido ampliamente estudiada y analizada por su propiedad antioxidante. Se ha comprobado que los componentes más importantes que le otorgan capacidad antioxidante son: el ácido carnósico y el carnosol, y los diterpenos antioxidantes tales como epirosmarinol, isorosmanol, rosmaridifenol, rosmariquinona y ácido rosmarínico (Peter, 2004).

La técnica de extracción con fluido supercrítico, principalmente CO₂ supercrítico, es utilizada para la obtención de OR enriquecida en ácido carnósico. Se ha investigado un fraccionamiento secuencial de la oleorresina de romero, utilizando la técnica de

extracción con fluido supercrítico en dos etapas, el fluido utilizado fue CO₂ y se varió la presión y la temperatura (Ibañez y colab., 1999).

Se ha demostrado que la obtención de OR a partir de hojas de romero mediante extracción con agua supercrítica a distintas temperaturas permite extraer selectivamente diferentes clases de compuestos antioxidantes (Ibañez y colab., 2003).

Visentin y colab. (2011) obtuvieron extractos fenólicos, ricos en ácido carnósico a partir de oleorresinas de romero producidas por extracción con etanol de hojas de romero secas, utilizando dióxido de carbono supercrítico (SCCO₂). Utilizan una boquilla especial para mezclar la corriente de SCCO₂ con la OR que contiene una alta viscosidad.

Rodríguez-Rojo y colab. (2012) extrajeron de la planta de romero antioxidantes mediante el uso de etanol y agua como solventes y han ensayado diferentes metodologías de extracción. Determinaron los compuestos fenólicos totales en los extractos por el ensayo de Folin-Ciocalteu y cuantificaron los principales compuestos antioxidantes (ácido rosmarínico y ácido carnósico) por medio de HPLC con detección UV. Además, determinaron la actividad antioxidante de los extractos por el ensayo de captación de DPPH[•]. Encontraron que el procedimiento de la extracción de aceite libre de disolvente y la trituración de las hojas seguida de una extracción asistida con un disolvente benigno (agua o etanol), proporciona un extracto de romero con contenido de antioxidantes igual o superior a los producidos por otras técnicas de extracción asistida o por diferentes procedimientos de los mismos procesos. Los extractos obtenidos tuvieron una cantidad de ácido rosmarínico entre 50 y 140 mg/g de extracto seco, un contenido de ácido carnósico en extractos etanólicos aproximadamente de 80 mg/g de extracto seco y un contenido de fenoles totales entre 110 y 180 mg EAG (equivalente a ácido gálico)/g de extracto seco.

1.2.2 Usos de la planta de romero

Las distintas condiciones de las plantas de romero y los métodos de extracción afectan la composición de los extractos que se obtienen y, por ende, a las propiedades del producto final. En base a estas diferencias, surgen distintos usos o aplicaciones de esta planta.

Tabla 1.2: Compuestos más comunes presentes en el aceite esencial de romero

Compuesto	Peso molecular	Fórmula química	Solubilidad en etanol	Punto de ebullición (°C)
α -pineno	136,24	C ₁₀ H ₁₆	Soluble	155 °C
canfeno	136,24	C ₁₀ H ₁₆	Soluble	159 °C
β -pineno	136,24	C ₁₀ H ₁₆	Insoluble	163-166 °C
mircenol	136,24	C ₁₀ H ₁₆	Soluble	166-167 °C
α -terpineno	136,24	C ₁₀ H ₁₆	Soluble	173 °C
limoneno	136,24	C ₁₀ H ₁₆	Soluble	175-177 °C
cimeno	134,22	C ₁₀ H ₁₄	Soluble	177 °C
γ -terpineno	136,24	C ₁₀ H ₁₆	Soluble	182 °C
verbenona	150,22	C ₁₀ H ₂₄ O	Soluble	227 °C
alcanfor	152,24	C ₁₀ H ₁₆ O	Soluble	204 °C
1,8-cineol ó eucaliptol	154,25	C ₁₀ H ₁₈ O	Soluble	176-177 °C
<i>cis</i> - sabineno hidrato ó 4-tujanol	154,25	C ₁₀ H ₁₈ O	-	<i>trans</i> 193-196 °C; <i>cis</i> 195-200 °C
linalol	154,25	C ₁₀ H ₁₈ O	1 ml en 2 ml alcohol al 70%; 1 ml en 4 ml alcohol al 60%	198 °C
terpinen-4-ol	154,25	C ₁₀ H ₁₈ O	Soluble	212 °C (d- isómero)
borneol	154,25	C ₁₀ H ₁₈ O	Soluble	213 °C
α -terpineol	154,25	C ₁₀ H ₁₈ O	1 ml en 2 ml alcohol al 70%; 1 ml en 4 ml alcohol al 60%	217 °C
geraniol	154,25	C ₁₀ H ₁₈ O	Soluble	230 °C
bornil-acetato	196,29	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	Soluble	226 °C
β -cariofileno	204,36	C ₁₅ H ₂₄	Soluble	256 °C
β -cariofileno epoxi	220,36	C ₁₅ H ₂₄ O	Soluble	280 °C

El hecho de que una sustancia proceda de una planta no quiere decir que no tenga efectos secundarios potencialmente peligrosos. Por esta misma razón existen aceites esenciales que, si se usan en grandes cantidades y/o con demasiada frecuencia pueden tener graves consecuencias para el organismo. Entre los principales usos tenemos: medicinal, aromaterapia y cosmética, insecticida, etc.

Características medicinales

De la planta de romero pueden obtenerse distintos extractos, y cada extracto se enriquece en componentes activos que le otorgan características medicinales.

Los flavonoides otorgan características de carminativo, el aceite esencial produce efecto antidepresivo y antiespasmódico, los diterpenos poseen efecto antimicrobiano, el ácido oleanólico le confiere propiedades de emanagogo, el carnosol, propiedades como anti-inflamatorio. El carnosol y el extracto completo de la planta hacen que el romero sea considerado un bloqueador carcinógeno y desintoxicante del hígado. Las pomadas enriquecidas con aceite de romero poseen efecto antirreumático (Peter, 2004).

En la medicina tradicional, los herboristas recomiendan el AER contra las enfermedades pulmonares, como cicatrizante de heridas estomacales, antidiarreico, antidiabético, diurético, antidepresivo y antiespasmódico. Toda la planta, en forma de decocción, infusión, extracto etanólico (para su aplicación externa) y aceite esencial, es administrada en algunas zonas de América Central contra los trastornos digestivos, vaginitis, leucorrea, enfermedades respiratorias, vena varicosa, dolor de corazón, inflamación y mareos. El romero, utilizado de forma inadecuada y en exceso puede producir anti-implantación, poseyendo efectos abortivos (Peter, 2004).

Aromaterapia y cosmética

Se encuentra que el masaje capilar con aceite de romero estimula los folículos pilosos y la circulación en el cuero cabelludo y por lo tanto puede ser útil en la calvicie prematura. El AER es útil en el control de la caspa, para promover el crecimiento del

cabello y controlar el cabello graso. El AER se utiliza también en el champú, para dar color negro en el pelo.

El destilado de flores en agua proporciona una loción calmante de ojos. El AER es un componente en jabones, ambientadores, desodorantes, perfumes, lociones para la piel, etc. El romero también es utilizado para tratamientos contra el acné. La flor, el cáliz y las hojas de romero se utilizan en popurrí, almohadas de hierbas, etc. (Peter, 2004).

Insecticidas del AER

El romero posee propiedades como repelente de insectos y antimicrobiano. Se encuentra que los pulgones pueden ser repelidos por el olor del romero. Los componentes del AER 1,8-cineol, alcanfor y α -pineno son los más importantes para repeler los pulgones. Se encontró que el AER (1 %) reduce la tasa de fecundidad de los ácaros depredadores *Amphyseiuszaheri* y *A. barkeri*. También se han informado actividades de disuasión de oviposición y repelente del AER sobre los ácaros de araña *Tetranychususticae* y *Eutetranychusorientalis*. En forma de vapor reduce la fecundidad, disminuye la incubabilidad de los huevos, aumenta la mortalidad de la larva neonatal y afecta adversamente la aparición de crías de gorgojos *Acanthoscelidesobtectus* (Peter, 2004).

1.3 Propiedades antioxidantes

A continuación se detallan las propiedades antioxidantes del aceite esencial de romero. Se introduce además el concepto de rancidez oxidativa, las técnicas para cuantificarla y los diferentes mecanismos para disminuirla o evitarla.

1.3.1 Rancidez oxidativa

La rancidez oxidativa es un proceso de oxidación que se produce en los ácidos grasos insaturados que constituyen las grasas y aceites. La susceptibilidad de una grasa

o un aceite al desarrollo de la rancidez oxidativa depende del contenido de ácidos grasos insaturados y del grado de insaturación que presenten. Este proceso produce deterioro estructural y cambios importantes en el valor nutricional de las grasas y aceites. Las formas químicas de gran reactividad del oxígeno, identificadas como radicales libres, podrían comportarse como agentes oxidantes o reductores. La formación de radicales libres es acelerada por la presencia de metales, especialmente de aquellos con valencia +2, por las altas temperaturas, por efecto de la luz solar o artificial, por otro tipo de irradiaciones y por la concentración de oxígeno (Pokorny y colab., 2001).

Los ácidos grasos activados son los que tienen en su estructura electrones desapareados, por consiguiente pueden reaccionar con el oxígeno molecular permitiendo su unión química a la molécula de ácido graso. Esta reacción da origen a los “peróxidos orgánicos” característicos del proceso de rancidez; éstos también son radicales libres y son los encargados de propagar la reacción en cadena. La finalización de la reacción en cadena se produce cuando se generan productos como cetonas, aldehídos, alcoholes, epóxidos, hidrocarburos y otros. Estos tienen la característica de ser volátiles y al liberarse a la atmósfera imparten el característico olor rancio que se percibe en las grasas y aceites en avanzado estado de oxidación (Pokorny y colab., 2001).

Existen factores que inhiben la oxidación, éstos son: mayor proporción de ácidos grasos saturados, bajas temperaturas, atrapadores de metales (quelantes), ausencia de agua, ausencia de microorganismos, presencia o adición de antioxidantes sintéticos o naturales.

1.3.2 Antioxidantes

Los antioxidantes tienen la propiedad de atrapar químicamente a los radicales libres, como consecuencia de sus características estructurales. Pueden actuar al nivel de la iniciación y/o de la propagación de la rancidez oxidativa. Reaccionan capturando a los radicales libres por donación de un átomo de hidrógeno. Al ocurrir esto, el propio antioxidante se convierte en radical libre, pero los antioxidantes pueden estabilizar estructuralmente el radical libre en el interior de la molécula, evitando así el efecto

propagador de los mismos. Toda vez que una molécula antioxidante captura un radical libre, pierde su capacidad de atrapar más radicales libres. Existen antioxidantes naturales y sintéticos (Pokorny y colab., 2001).

Los antioxidantes naturales están ampliamente presentes y distribuidos en la naturaleza. Los antioxidantes sintéticos tienen en la actualidad un amplio rango de aplicaciones no sólo en la industria alimentaria sino también en la farmacéutica, cosmética, de aditivos, plástica, de pinturas, etc. Los antioxidantes sintéticos son estructuras fenólicas con diferentes grupos sustituyentes. La estructura fenólica capta los radicales libres formando un híbrido de resonancia estable. Esto significa que cede un hidrógeno a los radicales libres sin transformarse a su vez en otro radical libre. Existe una cierta presión para aumentar el uso de antioxidantes de origen natural y sustituir a los sintéticos.

Los antioxidantes pueden clasificarse en: a) primarios y b) secundarios.

a) Antioxidantes primarios:

Se definen como aquellos que intervienen directamente en la interrupción de la reacción en cadena originada en la oxidación.

b) Antioxidantes secundarios:

Son compuestos que contribuyen a retardar la auto-oxidación de las grasas mediante mecanismos diferentes que los primarios. De acuerdo a como actúan pueden diferenciarse los siguientes grupos:

- Agentes quelantes de metales: remueven los metales que catalizan la oxidación.
- Removedores de oxígeno: reaccionan rápidamente con el oxígeno.
- Descomponedores de hidroperóxidos en productos finales estables: los fosfolípidos en ciertas condiciones liberan protones que resultan en una rápida descomposición de los hidroperóxidos sin formación de radicales libres.
- Regeneradores de antioxidantes primarios: por ejemplo, el ácido ascórbico que regenera el alfa-tocoferol (Pokorny y colab., 2001).

1.3.3 Determinación cuantitativa de la rancidez oxidativa

Existen métodos analíticos para la determinación cuantitativa de la rancidez oxidativa. Realizar estas determinaciones tiene una doble importancia ya que permite evaluar el estado de conservación de materias primas o de productos terminados y también permite determinar la eficiencia de un antioxidante o comparar el efecto de diferentes productos antioxidantes (Osawa y colab., 2006; Belcuore, 2007).

Los ensayos para estudiar la oxidación de un lípido se pueden dividir en predictivos o indicadores.

Los predictivos usan condiciones aceleradas para medir la estabilidad de una grasa o producto terminado. Estos ensayos pueden ser empleados para determinar la calidad de los ingredientes, medir la efectividad de conservantes o estimar la vida útil de un producto. Los ensayos indicadores tienen por objetivo cuantificar el deterioro oxidativo del producto o de sus ingredientes (Osawa y colab., 2006; Belcuore, 2007).

Ensayos predictivos

- AOM – *Active oxygen method*– Método del oxígeno activo.
- OSI – *Oil Stability Index* – Índice de estabilidad oxidativa.
- Índice de yodo.
- Ensayo de la bomba de oxígeno.

Ensayos indicadores de oxidación

- Índice de peróxido.
- Ensayo de TBA (ácido tiobarbitúrico).
- Índice de anisidina.
- Dienos y trienos conjugados.
- Índice de hexanal.
- Perfil del espacio de cabeza.
- AGL – Ácidos grasos libres.

1.3.4 Evaluación de la capacidad de captación del radical libre DPPH[•]

Para evaluar la actividad antioxidante del AER se pueden utilizar varios métodos. Uno de los más comúnmente utilizados es el método de captación de radicales libres, utilizando el radical libre DPPH[•]. Se establece el valor del índice de concentración EC₅₀ definido como la cantidad de muestra, en µl/ml, que produce una disminución de la concentración de DPPH[•] al 50 %. Un alto valor de EC₅₀ indica una débil capacidad de captación de radicales libres, reflejando una baja capacidad antioxidativa del extracto (Brand-Williams, 1995).

1.3.5 Propiedad antioxidante de la oleoresina de romero

Las propiedades antioxidantes del romero se atribuyen a su capacidad para eliminar radicales superóxido, a la antioxidación lipídica, a su acción quelante de metales, etc. Los radicales libres y las especies reactivas al oxígeno están asociados con muchos fenómenos biológicos, tales como inflamación, envejecimiento, y carcinogénesis. La actividad antioxidante de los extractos polares de romero se relaciona con el contenido de compuestos fenólicos (por ejemplo, carnosol, ácido carnósico). Componentes de romero han demostrado una variedad de actividades farmacológicas para la quimio-prevención y tratamiento del cáncer en modelos *in vitro* e *in vivo* (Pokorny y colab., 2001).

Según Peter (2001), la OR obtenida con hexano es mejor antioxidante para la manteca de cerdo, y aceites de colza y girasol, que los extractos metanólicos y etanólicos. El uso de extractos de hexano (0,05 %) provoca un incremento de 35 veces en la estabilidad oxidativa de la manteca de cerdo determinada a 100 °C, mientras que el uso de extractos etanólicos (0,05 %), un incremento de 20 veces la estabilidad oxidativa. Extractos en hexano de salvia y romero son más eficientes que los extractos en acetato de etilo y acetona al analizarlos aplicados en aceite de colza a granel. Los extractos de romero son más activos que los extractos de salvia.

Además, se analizó la eficacia de la OR en salchichas de pavo y se encontró que la OR fue tan eficaz como la combinación de hidroxibutilanisol (BHA),

hidroxitoluenobutilado (BHT) con ácido cítrico, en la supresión de la rancidez oxidativa. La OR tiene muchos componentes fenólicos diferentes.

Al estudiar 16 compuestos de romero aislados se concluyó que la actividad antioxidante de los extractos de romero se relaciona principalmente con dos diterpenos fenólicos, carnosol y ácido carnósico. También se ha encontrado que rosmanol y carnosol son más efectivos que tocoferol, BHT y BHA (Peter, 2001).

Se ha demostrado que la OR aplicada en el filtro de cigarrillo causó una disminución superior al 70 % en los niveles de benzopirenos. Esto permite reducir el riesgo de cáncer de pulmón en adictos al cigarrillo (Alexandrov y colab., 2006).

Extractos etanólicos de romero (0,15g/100g) dados a ratas durante 3 semanas mostraron efectos hepatoprotectores y antimutagénicos atribuidos a la presencia de un porcentaje relativamente alto de compuestos fenólicos con alta actividad antioxidante (Faixová y colab., 2008).

1.3.6 Propiedad antioxidante del aceite esencial de romero

Resultados de varias experiencias muestran que el AER tiene propiedades antimicrobianas, antioxidantes y de mejoras cognitivas, propiedades que hacen que sea bueno como un aditivo alimenticio natural. Se han realizado estudios acerca del poder antioxidante del AER, pero los resultados de las investigaciones son algunas veces contradictorios. Este lado débil en las investigaciones debe explicarse comparando el potencial antioxidante de diferentes sustratos por métodos alternativos.

Se han realizado investigaciones donde se evalúa la actividad antioxidante de dos AER producidos a partir de dos fenotipos diferentes de romero cultivados en el mismo lugar de Argentina. Otras investigaciones donde se comparan varios aceites esenciales con AER. Otras donde se analizan AER provenientes de distintas etapas de cosecha de la planta. Todas estas investigaciones demostraron que el AER tiene buenas propiedades antioxidantes (Sacchetti y colab., 2005; Bozin y colab., 2007; Beretta y colab., 2011; Ojeda-Sana y colab., 2013).

Sacchetti y colab. (2005) estudiaron la composición, actividad antioxidante y antimicrobiana de 11 aceites esenciales de diferentes especies. El AER tuvo el segundo

mayor valor de actividad antioxidante medido por la actividad secuestrante del radical libre DPPH[•] y por el método de blanqueo del β -caroteno. Los autores postularon que la verbenona y el borneol presentes en el AER pueden ser los principales responsables de su actividad antioxidante.

Kadri y colab. (2011) estudiaron la actividad antioxidante del AER por medio de la capacidad secuestrante del radical libre DPPH[•] y por el método de blanqueo del β -caroteno. En los dos métodos el AE mostró actividad antioxidante, siendo ésta menor a la del BHT. Postularon que la actividad antioxidante pudo ser debida a la presencia de componentes como 1,8-cineol, α -pineno, β -pineno, α -thujeno, trans-cariofileno, β -thujeno, borneol y alcanfor. También Bozin y colab. (2007) asignaron el poder antioxidante a monoterpenos oxigenados y a la mezcla de sesquiterpenos carbonados.

Beretta y colab. (2011) también trabajaron con AER, y atribuyeron el poder antioxidante a los éteres, alcoholes y compuestos fenólicos presentes en el AER. Los métodos de determinación de la capacidad antioxidante del AER utilizados en este trabajo fueron: la actividad secuestrante del radical libre DPPH[•], análisis del efecto de la peroxidación lipídica y el método de blanqueo del β -caroteno.

Ojeda-Sana y colab. (2013) estudiaron la relación entre los componentes presentes en 2 fenotipos diferentes de AER cultivados en el mismo lugar de Argentina y la actividad antioxidante y antibacterial de los mismos. Los dos fenotipos tuvieron composiciones muy diferenciadas; uno perteneció al quimiotipo mirceno, mientras que el otro fenotipo correspondió al quimiotipo α -pineno. El AER quimiotipo mirceno demostró tener mayor actividad antioxidante y los autores concluyen sobre la probable acción del alto contenido de mirceno (31,1 %) en su composición.

1.4 Destilación molecular

La operación de destilación molecular (DM), también llamada destilación de camino corto, es una técnica de separación utilizada con frecuencia en la purificación de compuestos de baja volatilidad y termolábiles.

Si bien pueden utilizarse diferentes técnicas (destilación fraccionaria bajo vacío, hidrodestilación, extracción por solvente, etc.) para la obtención de productos

concentrados en compuestos de importante interés nutracéutico a partir de aceite esencial de romero, dadas las características termosensibles de los mismos, la DM es la tecnología más promisoría de ser utilizada.

La operación de DM es una tecnología adecuada para la separación, purificación y/o concentración de sustancias termolábiles con baja presión de vapor. Se basa en la evaporación de componentes en una mezcla y su inmediata condensación en una superficie muy cercana. Este fenómeno tiene lugar en dos tipos de destiladores: de película descendente o centrífugo (Pramparo y colab., 2008). La operación se lleva a cabo a muy alto vacío en un equipo construido de tal modo que la distancia recorrida por las moléculas entre las superficies de evaporación y condensación es más corta que el recorrido libre medio de las moléculas evaporadas (Pramparo y colab., 2005).

El destilador de película descendente usa la fuerza de gravedad para promover una capa fina sobre el cilindro evaporador, usualmente con un rotor con rodillos que mezcla y distribuye el líquido sobre la superficie del evaporador. El destilador centrífugo, en cambio, utiliza la fuerza centrífuga para producir la capa fina. Dos corrientes de producto son generadas, el destilado, rico en las moléculas que se desprenden del evaporador y llegan al condensador y el residuo rico en las moléculas más pesadas (Fregolente y colab., 2007).

La principal característica operativa es la presión de trabajo ya que se alcanzan altos niveles de vacío. Bajo estas condiciones, la volatilidad de los componentes se incrementa y la temperatura de operación disminuye, permitiendo la separación de los componentes a baja temperatura. Las moléculas que se separan de la superficie de evaporación prácticamente no sufren colisiones a las bajas presiones de operación; éstas llegan a la superficie de condensación en un período muy corto de tiempo, y es por esta razón que se alcanzan altas velocidades de evaporación. Bajo estas dos condiciones, tiempos de residencia cortos y bajas temperaturas, la descomposición térmica de los componentes se reduce y la separación ocurre a velocidades aceptables (Pramparo y colab., 2008).

Se han llevado a cabo varios trabajos de investigación, en los que se comprobó la eficacia de la operación de destilación molecular para el tratamiento de materiales

termolábiles. Sin embargo, no hay muchos estudios realizados en la aplicación de la DM para el fraccionamiento de aceites esenciales.

Martins y colab. (2012) evaluaron el enriquecimiento de metil-chavicol a partir del aceite esencial de albahaca utilizando la operación de DM. Estudiaron las variables temperatura del evaporador, temperatura del condensador y flujo de alimentación. Lograron concentrar el contenido de metil-chavicol desde un 83,81 % hasta un 89,79 %; el compuesto de interés se obtiene en la corriente de residuo de la operación de destilación molecular.

Guala y colab. (2009) fraccionaron por destilación al vacío aceite esencial de aguaribay y analizaron la conveniencia de la operación al analizar las características antioxidantes del aceite crudo y de fracciones del mismo. Determinaron que el residuo de la destilación es el que presenta los mayores valores de actividad antioxidante, y mediante el análisis cromatográfico de las muestras se determinó que la composición de estos residuos evidencia mayores cantidades de terpinen-4-ol y germacreno D, compuestos postulados por los autores como los principales causantes del mayor potencial antioxidante.

Rossi y colab. (2011) estudiaron la factibilidad de la técnica de DM para separar y concentrar componentes terpénicos y oxigenados a partir de AE de limón. Concluyeron que la variación en la velocidad del flujo de alimentación les permitió obtener un amplio rango de productos con diferentes propiedades y características.

Borgarello y colab. (2014) obtuvieron fracciones de AE de orégano enriquecidas en propiedades antioxidantes por medio de la operación de DM. Variaron la temperatura de evaporación entre 22 y 30 °C, y la presión de operación entre 0,7 y 53,0 mbar. Con ello lograron obtener fracciones en el residuo con propiedades antioxidantes similares al antioxidante sintético BHT; estas fracciones se concentraron en el compuesto timol, y los autores postularon que la alta capacidad de captación del radical libre DPPH• pudo deberse a la presencia de este monoterpeno fenólico.

Cabe destacar que hasta el momento no se han encontrado antecedentes sobre la obtención de concentrados de aceite esencial de romero por destilación molecular, lo que podría evidenciar el comportamiento de las distintas fracciones que se podrían obtener, potenciadas en diferentes componentes, confirmando de esta manera el aporte

de cada uno a la actividad antioxidante y a posibles sinergismos presentes en las mezclas de los mismos. Por otra parte, las diferentes fracciones pueden evidenciar distintas capacidades como antioxidante, obteniéndose de esta manera diferentes productos distintivos del aceite esencial original.

1.5 Hipótesis

Entre los extractos naturales con potencial antioxidativo se encuentran los provenientes del romero, objeto de estudio en esta tesis. La operación de destilación molecular permite obtener fracciones de aceite esencial de romero enriquecidas en compuestos antioxidantes, los cuales pueden ser incorporados a los alimentos para conservar sus propiedades naturales.

1.6 Objetivos

Objetivo general

El objetivo general de la presente Tesis es obtener fracciones concentradas en compuestos antioxidantes mediante el uso de la tecnología de destilación molecular a partir de aceite esencial de romero obtenido por hidrodestilación.

Objetivos específicos

1. Obtener aceite esencial de romero por hidrodestilación, analizando el efecto de la cantidad de romero utilizada y el caudal de vapor sobre el rendimiento de la operación (Capítulo 2).
2. Ensamblar un prototipo de destilación molecular. Llevar a cabo su puesta a punto, establecer el procedimiento experimental adecuado y obtener los rangos de condiciones operativas posibles para que dicho prototipo pueda ser utilizado en el procesamiento de aceite esencial de romero (Capítulo 3).

3. Obtener fracciones de alto poder antioxidante mediante destilación molecular y relacionar la capacidad antioxidante con la composición de las fracciones obtenidas (Capítulo 4).
4. Determinar la estabilidad oxidativa de muestras de girasol enriquecidas con las fracciones de interés obtenidas por destilación molecular (Capítulo 5).
5. Optimizar el proceso de destilación molecular aplicando herramientas de simulación basadas en redes neuronales (Capítulo 6).

CAPÍTULO 2

Obtención de aceite esencial de romero por hidrodestilación

En este capítulo se presentan los resultados de los ensayos llevados a cabo para obtener aceite esencial de romero utilizando la operación de hidrodestilación. Se presenta el estudio del efecto de la cantidad de romero utilizada y el caudal de vapor sobre el rendimiento de la operación, así como las características del aceite esencial obtenido.

2.1 Introducción

2.1.1 Obtención de aceite esencial de romero

Existen varios métodos para extraer el aceite esencial. Como una consecuencia de esto, los perfiles químicos de los aceites esenciales producidos no sólo difieren en el número de moléculas, sino también en el tipo estereoquímico de moléculas extraídas de acuerdo al tipo de extracción. El producto extraído puede variar en calidad, cantidad y composición de acuerdo al clima, características del suelo, órgano de la planta, edad y etapa del ciclo vegetativo.

El romero no es ajeno a estas influencias y la composición del AE exhibe variación en su composición, con respecto a la ubicación de la planta, etapa del ciclo vegetativo, tipo de suelo, condiciones de sembrado de la planta, etc. (Bakkali y colab., 2008).

La operación más utilizada para la extracción de AER es la técnica tradicional de hidrodestilación. El hidrodestilador, equipo en donde se produce la hidrodestilación, es cargado por lotes y trabaja en modo semicontinuo. Dicho equipo posee un condensador, el cual funciona en modo continuo, con el flujo del agua de refrigeración a contracorriente. El funcionamiento de este equipo depende del tipo de material a procesar y todas sus posibles variaciones como época del año de la recolección, el lugar geográfico donde se encuentre la misma, parte de la planta utilizada para la obtención de AE, etc. (Rodríguez Álvarez y colab., 2012).

El rendimiento de la operación de hidrodestilación es muy variable. Entre las variables que han mostrado una importante influencia se encuentran: parte de la planta utilizada para la extracción (tallos, hojas, flores), etapa de cosecha, zona de cultivo, cantidad y variedad de fertilizantes, porosidad del lecho, caudal de agua y humedad de la planta (Boutekedjiret y colab., 1998; Cerpa, 2007; Okoh y colab., 2010; Jordan y colab., 2013; Yosr y colab., 2013; Singh y colab., 2013; Hosni y colab., 2013; Santana-Méridas y colab., 2014). El rendimiento de la operación de hidrodestilación de AER varía entre 0,0021 y 3,15 g de aceite esencial por cada 100 g de planta seca, lo que genera una considerable cantidad de residuo sólido (Okoh y colab., 2010; Hosni y colab., 2013; Yosr y colab., 2013; Singh y colab., 2013; Santana-Méridas y colab., 2014).

El rendimiento del AER se analiza y presenta mucha importancia en la economía de las empresas que lo producen, por lo que muchos investigadores han realizado estudios en el tema.

Yosr y colab. (2013) utilizaron muestras de romero provenientes de Túnez, ciudad situada en el norte de África. El AER fue extraído por hidrodestilación y se compararon rendimientos en función de distintas partes de la planta utilizada y de la etapa de cosecha de la planta. El rendimiento del AER producido fue muy variable. Los rendimientos más bajos de AER los obtuvieron de los tallos de las plantas (0,0021 % - 0,0070 %). Cuando la extracción se realizó mezclando hojas y tallos obtuvieron un

rendimiento intermedio (0,40 % - 0,71 %), y los rendimientos más altos se obtuvieron de la extracción de AER de las hojas (0,81 % - 1,43 %). En todos los casos la mayor cantidad de AER se obtuvo cuando la cosecha se realizó en etapa de floración.

Singh y colab. (2013) estudiaron la influencia de las distintas etapas de cosecha de la planta de romero en la India y de la aplicación de distintos fertilizantes, sobre el rendimiento y la composición de AER. Los resultados revelaron que el contenido y la composición del AER fue influenciado por la etapa de cosecha, pero no fueron afectados por los distintos niveles y tipos de fertilizantes aplicados. El rendimiento en la operación de hidrodestilación varió entre 2,43 y 3,89 % en base seca.

Cerpa (2007) ha analizado las siguientes variables: porosidad del lecho de la hierba y caudal de agua. Concluyó que los rendimientos de AER producido no guardan relación con la variación del caudal de vapor ni con la porosidad del lecho. Sin embargo la velocidad de obtención del aceite esencial depende de la porosidad del lecho y del caudal de vapor.

Jordan y colab. (2013) obtuvieron AER por hidrodestilación de romero proveniente de la zona mediterránea. El rendimiento del aceite esencial obtenido presentó diferencias significativas al comparar distintas áreas termoclimáticas de la región del Mediterráneo. Los rendimientos variaron entre 1,36 % y 3,33 % determinados como ml de AER obtenido por 100 g de material seco. Este fenómeno puede atribuirse a ciertos factores ambientales que podrían estimular la producción de AE a partir de las plantas de romero.

Hosni y colab. (2013) evaluaron cómo los pretratamientos enzimáticos aplicados a la planta de romero afectaban los rendimientos del AER. Obtuvieron AER mediante hidrodestilación a partir de plantas de romero provenientes de Túnez. El tratamiento enzimático produjo un aumento en el rendimiento de la cantidad de AER producido. Los rendimientos resultantes fueron de 1,20 % para el AER sin pretratamiento, y un aumento en 5 % para el tratamiento con la enzima celulasa, brindando un rendimiento del 1,26 %, 50 % de aumento para la enzima hemicelulasa, arrojando un rendimiento de 1,80 % y un aumento del 20 % para la combinación de ambas enzimas dando un rendimiento de 1,44 %.

Okoh y colab. (2010) comparan dos procesos de obtención de AER, hidrodestilación (HD) y extracción por microondas sin disolventes (EMSD). Las muestras de hojas de romero fueron provenientes de la provincia de El Cabo, Sudáfrica. Los rendimientos de los AER obtenidos por ambos métodos fueron de 0,31 % para el proceso de hidrodestilación y 0,39 % para el proceso de extracción por microondas.

2.1.2 Perfiles cromatográficos del aceite esencial de romero

La variedad de composiciones de AER es muy amplia, pudiendo determinar distintos quimiotipos. Las composiciones se analizan mediante cromatografía gaseosa con espectrómetro de masas.

Jordan y colab. (2013) analizaron las composiciones de diferentes AER obtenidos a partir de plantas de distintas regiones del Mediterráneo. Las diversas regiones termoclimáticas (R1, R2, R3, R4, y R5) no presentaron diferencias significativas en la composición del AER y los compuestos mayoritarios en todas las muestras fueron los mismos: 1,8-cineol, alcanfor y α -pineno.

Okoh y colab. (2010) encontraron que los componentes principales del AER fueron α -pineno, canfeno, alcanfor, verbenona, borneol y 1,8-cineol, perteneciendo el mismo al quimiotipo verbenona.

Soltani y colab. (2014) obtuvieron AER mediante hidrodestilación a partir de romero provenientes de las provincias de Fars y Teherán, Irán. Obtuvieron un AER quimiotipo α -pineno.

Usai y colab. (2011) obtuvieron AER mediante hidrodestilación a partir de romero proveniente de la isla de Cerdeña, Italia; el mismo pertenece al quimiotipo α -pineno-verbenona.

Wang y colab. (2008) trabajaron con AER proveniente de la provincia de Si Chuan (China) obtenido mediante hidrodestilación. Analizaron e identificaron cromatográficamente 19 componentes. Los componentes mayoritarios fueron 1,8-cineol (27,23 %), α -pineno (19,43 %), alcanfor (14,26 %), canfeno (11,52 %) y β -pineno (6,71 %), perteneciendo en este caso al quimiotipo 1,8-cineol.

Barreto y colab. (2014) trabajaron con AER proveniente de San Pablo (Brasil), obtenido mediante hidrodestilación. Los principales componentes que identificaron fueron 1,8-cineol (30,87 %), alcanfor (10,13 %), α -pineno (9,79 %), β -pineno (9,24 %), β -cariofileno (6,76 %) y canfeno (5,14 %), dando un AER quimiotipo 1,8-cineol.

Yosr y colab. (2013) encontraron variaciones significativas en la composición del AER en función de la parte de la planta utilizada para la obtención del aceite. El AER obtenido a partir de las hojas de romero tuvo un alto contenido de 1,8-cineol (35,8 %), alcanfor (14,5 %) y α -pineno (10,6 %), mientras que β -cariofileno (16,68 %) se identificó como el constituyente principal de tallos. Las flores, en cambio, se caracterizaron por altos niveles de óxido de cariofileno (11,4 %).

Nieto y colab. (2013) trabajaron con AER proveniente de Barcelona (España) obtenido mediante hidrodestilación. Identificaron cromatográficamente al mismo y los principales componentes que obtuvieron fueron α -pineno (36,42 %), alcanfor (15,05 %), 1,8-cineol (12,02 %), canfeno (11,08 %), borneol (4,00 %), β -pineno (3,67 %), p-cimeno (2,14 %) y γ -terpineno (0,18 %), obteniendo un AER quimiotipo α -pineno.

En la Tabla 2.1 se presenta una recopilación de las composiciones del AER encontradas en la bibliografía referida. En la misma puede observarse el amplio rango de resultados en las composiciones de los AER.

La composición de los compuestos principales varía entre los siguientes valores: 1,8-cineol (8-36 %), alcanfor (3-24 %), α -pineno (8-37 %), borneol (0-8 %), verbenona (1-25 %), acetato de bornilo (0-12 %), canfeno (3-12 %), β -pineno (0-10 %) y β -cariofileno (0-7 %).

2.2 Objetivos

Los objetivos propuestos en este capítulo son: obtener aceite esencial de romero utilizando un equipo de hidrodestilación y analizar el efecto de la cantidad de romero y el caudal de vapor sobre el rendimiento de la operación.

Tabla 2.1: Recopilación de las composiciones del aceite esencial de romero de la bibliografía referida

Componentes	Composición %p/p										
	Wang y colab., 2008	Barreto y colab., 2014	Jordan y colab., 2013					Soltani y colab., 2014	Usai y colab., 2011	Okoh y colab., 2010	
			R1	R2	R3	R4	R5			HD	EMSD
acetato de butilo		1,33									
1,7,7-trimetiltriciclo [2.2.1.0 ^{2,6}]heptano		0,98	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3				
α -tujeno	0,43	2,23	0,1	tr	0,1	0,1	0,1				
α -pineno	19,43	9,79	15,6	19,2	14,6	16,2	14,1	19,15	23,06	11,47	8,14
canfeno	11,52	5,14	8,4	8,0	7,7	7,4	6,5	6,43	4,50	5,70	3,13
sabineno			tr	tr	tr	tr	tr				
β -pineno	6,71	9,24	1,1	1,1	1,2	1,6	2,2	2,67	2,16	1,12	1,06
4-octanona			0,1	0,3	0,4	0,4	0,9	1,96			
mirceno			1,6	3,7	2,7	3,3	3,4	2,64		1,25	1,18
3-octanol			tr	tr	tr	tr	0,1				
α -felandreno			0,3	0,5	0,5	0,7	0,5			0,41	0,32
δ -3-careno			0,2	0,4	0,7	0,4	0,7				
β -felandreno	1,23										

HD: hidrodestilación, EMSD: extracción por microondas sin disolventes, R1, R2, R3, R4, y R5: diversas regiones termoclimáticas del Mediterráneo

Tabla 2.1 (Continuación): Recopilación de las composiciones del aceite esencial de romero de la bibliografía referida

Componentes	Composición %p/p										
	Wang y colab., 2008	Barreto y colab., 2014	Jordan y colab., 2013					Soltani y colab., 2014	Usai y colab., 2011	Okoh y colab., 2010	
			R1	R2	R3	R4	R5			HD	EMSD
α -terpineno	0,41		0,6	0,8	0,8	0,9	0,7			1,23	1,32
p-cimeno	1,67		2,9	2,5	2,3	2,3	1,5				
limoneno	1,95		2,9	3,9	3,3	3,4	3,1		3,33		
1,8-cineol	27,23	30,87	22,1	19,1	19,7	21,1	18,9	9,05	8,91	11,91	10,56
γ -terpineno		0,44	0,7	0,8	0,9	1,1	1,0		1,92	0,98	1,06
terpinoleno			0,7	0,9	1,2	1,0	1,1		1,36		
linalol	0,25	1,46	0,7	1,2	1,1	1,2	0,9	2,37	1,95	2,02	3,00
α -canfolenal			0,3	0,2	0,3	0,2	0,3				
alcanfor	14,26	10,13	18,5	15,0	20,2	17,7	24,0	8,50	3,12	16,57	16,89
isoborneol		4,66									
isopulegol	1,19										
borneol	3,17		7,1	6,6	5,8	5,2	4,1	6,35	3,49	5,74	5,86
terpinen-4-ol	0,53	1,80	1,0	1,2	1,2	1,2	1,0		1,52	1,42	1,56
ρ -cimen-8-ol			0,2	0,2	0,2	0,1	0,1				
α -terpineol	2,11	3,07	2,8	2,8	2,8	2,8	2,7	1,58	1,70		

HD: hidrodestilación, EMSD: extracción por microondas sin disolventes, R1, R2, R3, R4, y R5: diversas regiones termoclimáticas del Mediterráneo

Tabla 2.1 (Continuación): Recopilación de las composiciones del aceite esencial de romero de la bibliografía referida

Componentes	Composición %p/p										
	Wang y colab., 2008	Barreto y colab., 2014	Jordan y colab., 2013					Soltani y colab., 2014	Usai y colab., 2011	Okoh y colab., 2010	
			R1	R2	R3	R4	R5			HD	EMSD
bornilacético		3,45									
α -copaeno		1,30									
mirtenol									1,32	1,37	1,09
verbenona	1,48		5,4	5,0	4,8	5,1	4,0	3,03	24,11	17,43	23,79
geraniol									1,79		
cuminaldeido			tr	0,1	0,1	0,1	0,1				
acetato de bornilo	1,13		0,7	1,1	0,8	1,0	1,2		5,50	9,19	11,62
ylangeno			0,1	0,1	0,1	0,1	0,1				
β -cariofileno	2,41	6,76	0,4	0,8	1,2	1,0	1,6			0,17	1,11
<i>cis</i> -jasmono										0,07	0,08
α -cariofileno	0,86		0,2	0,2	0,3	0,3	0,6				
<i>trans</i> β -ocimeno										0,11	
<i>cis</i> - sabineno hidrato											0,32
α -amorfeno			0,1	0,1	0,1	0,1	0,1				
α -humuleno		2,00									0,15

HD: hidrodestilación, EMSD: extracción por microondas sin disolventes, R1, R2, R3, R4, y R5: diversas regiones termoclimáticas del Mediterráneo

Tabla 2.1 (continuación): Recopilación de las composiciones del aceite esencial de romero de la bibliografía referida

Componentes	Composición %p/p										
	Wang y colab., 2008	Barreto y colab., 2014	Jordan y colab., 2013					Soltani y colab., 2014	Usai y colab., 2011	Okoh y colab., 2010	
			R1	R2	R3	R4	R5			HD	EMSD
pentasiloxano											0,04
γ -muroleno		1,19									
γ -cadineno		0,65									
δ -cadineno(+)(-)		1,15									
cariofileno óxido		2,23	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3				0,04
1,5-difenil 2H-1,2,4 triazolina											0,13
1-metil-2,4-nitrofenil benzimida											0,31
2-metoxi-3,8-dioxocefalotax-1-ene											1,11
ácido 1,2-bencenodicarboxílico											0,44
ácido octadecanoico											0,26
ácido decanoico											0,27

HD: hidrodestilación, EMSD: extracción por microondas sin disolventes, R1, R2, R3, R4, y R5: diversas regiones termoclimáticas del Mediterráneo

2.3 Materiales y métodos

2.3.1 Materia prima

La variedad de romero utilizada fue *R. officinalis L.* cultivado en el Establecimiento “Los Molles” de la ciudad de Merlo provincia de San Luis, cosecha marzo de 2013. Se utilizaron las hojas de la planta ya que son las que presentan mayor rendimiento en la producción de aceite esencial.

2.3.2 Operación de hidrodestilación

La materia prima vegetal fue cargada en el hidrodestilador formando un lecho fijo compactado. El vapor de agua se produjo en su base con la presión suficiente para vencer la resistencia del lecho. Conforme el vapor entró en contacto con el lecho, la materia prima se calentó y liberó el AER contenido y éste, a su vez, debido a su alta volatilidad se evaporó. El AER fue arrastrado corriente arriba hacia el tope del hidrodestilador por el vapor de agua. La mezcla, vapor saturado y AER, fluyó hacia el condensador. En el mismo, la mezcla fue condensada y enfriada, hasta temperatura ambiente. La mezcla se acumuló en el florentino y se separó por diferencias de densidades. El vapor condensado acompañante del AER, es llamado “agua floral”. Esta posee una pequeña concentración de los compuestos químicos solubles del aceite esencial, lo cual le otorga un ligero aroma, semejante al aceite obtenido. El proceso terminó cuando el volumen de AER acumulado en el florentino no varió con el tiempo de extracción. A continuación, el aceite fue retirado del florentino y almacenado en un recipiente y lugar apropiado.

El equipo hidrodestilador que se utilizó para la obtención del AER fue un equipo de vidrio, marca Figmay, Córdoba- Argentina, con capacidad de 6 l. El mismo consiste de un cuerpo de vidrio de forma cilíndrica, en cuyo interior se depositan los canastos que contienen las hojas de romero. En la parte inferior tiene una resistencia que calienta el agua con el fin de producir el vapor necesario para arrastrar el aceite esencial contenido en las hojas.

En la Figura 2.1 se muestra una imagen del equipo utilizado y en la Figura 2.2 se muestra la separación de la mezcla; la fracción inferior transparente corresponde al agua floral y la fracción superior al AER.

Se analizó la influencia del caudal de vapor de agua y de la cantidad de romero utilizada sobre el rendimiento de aceite esencial producido. El caudal de vapor de agua empleado en el equipo se reguló mediante la resistencia eléctrica variando los niveles de consumo de potencia. Se determinó la humedad del romero con el fin de expresar el rendimiento de la operación como función del peso de romero utilizado en base seca. La misma se determinó manteniendo las muestras en estufa a 105 °C hasta alcanzar peso constante.

El rendimiento porcentual de la operación de hidrodestilación de romero (η) se determinó de la siguiente manera:

$$\eta = \frac{\text{peso aceite (g)}}{\text{peso romero en base seca (g)}} \times 100$$



Figura 2.1: Equipo hidrodestilador Figmay



Figura 2.2: Aceite esencial de romero obtenido en equipo hidrodestilador Figmay

2.3.3 Análisis cromatográfico

Las cromatografías necesarias para determinar la composición del AER obtenido por hidrodestilación se realizaron en un equipo GC-MS Clarus 600, Perkin Elmer. Los datos fueron adquiridos empleando el programa TurboMass 5.4.2. La columna utilizada fue una columna DB5 marca Perkin Elmer. El gas carrier fue Helio. La temperatura del inyector se fijó en 250°C y el programa de temperatura del horno se inició en 60°C, manteniéndose constante por 5 minutos, luego se aumentó a razón de 5°C/min hasta llegar a 240°C, donde se mantuvo a esa temperatura por 10 minutos. La identificación de picos se realizó empleando las Bibliotecas del programa NIST MS Search 2.0.

2.3.4 Análisis estadístico

Las experiencias se realizaron por duplicado; se informan los valores medios y las desviaciones estándar de los resultados. Se analizaron estadísticamente los datos obtenidos, a fin de indagar cuáles son las variables que presentan influencia estadísticamente significativa en el rendimiento de AER. Los datos fueron analizados utilizando el Software InfoStat, versión 2012.p (Facultad de Ciencias Agropecuarias,

Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina). Las diferencias estadísticas fueron estimadas por la prueba ANOVA a un nivel de significancia del 5 % ($p < 0,05$). Cuando el test ANOVA indicó la existencia de diferencias estadísticamente significativas se realizó una comparación de medias por el método de la mínima diferencia significativa (LSD).

2.4 Resultados y discusión

2.4.1 Análisis de la operación de hidrodestilación

En la Tabla 2.2 se detallan las condiciones de hidrodestilación estudiadas y el rendimiento porcentual obtenido en cada uno de los ensayos realizados. Se informa el valor medio y la desviación estándar de los caudales de flujo y los rendimientos obtenidos. Luego de haber observado en ensayos previos la variación de la producción de AER con el tiempo, se ha fijado el tiempo de extracción en 60 minutos. Esto es debido a que en ese tiempo se asegura la finalización del proceso de hidrodestilación. De esta manera, el tiempo de extracción no fue una variable analizada.

Al analizar los datos presentados en la Tabla 2.2 se observa que el rendimiento de aceite de las muestras en que se utilizaron 400 g de romero fue, en todos los casos, superior al rendimiento obtenido en los casos que se utilizaron 200 g. Sin embargo, se procedió a analizar estadísticamente estos datos, a fin de indagar cuáles son las variables que presentan influencia estadísticamente significativa en el rendimiento de AER. Para ello se realizó un análisis de varianza de las muestras, ANOVA, y se concluyó que la cantidad de romero utilizada y el caudal de vapor producido no son variables estadísticamente significativas sobre el rendimiento de AER obtenido (p -valor $> 0,05$).

Los resultados de este análisis concuerdan con Cerpa Chávez (2007), quien en su Tesis Doctoral titulada “Hidrodestilación de aceites esenciales: Modelado y caracterización” realizó un análisis de la influencia del caudal de vapor y de la porosidad del lecho en la producción de AER. En este análisis llega a la conclusión de

que los rendimientos de AER producido no guardan relación ni con la variación del caudal de vapor ni con la porosidad del lecho.

Tabla 2.2: Rendimientos (η) de AER en diferentes condiciones de hidrodestilación: peso de romero procesado y caudal de vapor. Materia prima: hojas de romero con una humedad del 5,5 %.

Peso de romero base húmeda (g)	Nivel de resistencia	Caudal de vapor promedio (ml/min)	Rendimiento porcentual de AER (η)
200,0	6	7,19 \pm 1,57	1,43 \pm 0,06
400,0	6	7,19 \pm 1,57	1,54 \pm 0,06
200,0	7	10,85 \pm 0,95	1,52 \pm 0,07
400,0	7	10,85 \pm 0,95	1,65 \pm 0,29
200,0	8	14,54 \pm 2,25	1,47 \pm 0,23
400,0	8	14,54 \pm 2,25	1,52 \pm 0,20

Los resultados de rendimiento de la operación de hidrodestilación variaron entre 1,43 \pm 0,06 y 1,65 \pm 0,29 % (base seca) arrojando un rendimiento porcentual promedio del AER de 1,53 \pm 0,17 % (base seca). Estos resultados están dentro de los rangos analizados y son altos rendimientos comparados con los citados anteriormente. Cerpa Chávez (2007) obtuvo un rendimiento promedio de 1,35 % g aceite/g planta húmeda.

2.4.2 Análisis cromatográfico del aceite esencial de romero

Los resultados del análisis cromatográfico del AER obtenido se muestran en la Tabla 2.3.

El AER obtenido por el proceso de hidrodestilación tiene como principales componentes β -pineno, 1,8-cineol, alcanfor y α -pineno, perteneciendo al quimiotipo β -pineno. El porcentaje obtenido para el compuesto β -pineno es superior a los encontrados en bibliografía.

Tabla 2.3: Composición del aceite esencial de romero obtenido por hidrodestilación.

Compuesto	% p/p
α -pineno	9,51
canfeno	3,23
β -pineno	31,04
cimol	4,84
limoneno	3,96
1,8-cineol	24,09
β -linalol	1,70
alcanfor	15,27
NI*	0,38
NI*	1,05
α -terpineol	2,20
verbenona	1,18
cariofilleno	1,21
NI*	0,35

*NI: Compuesto no identificado

2.5 Conclusiones

Con las experiencias realizadas en el presente trabajo se concluye que el caudal de vapor y la cantidad de romero utilizado no influyen en el rendimiento de aceite esencial producido. El rendimiento de aceite esencial producido fue de $1,53 \pm 0,17$ % g aceite/ g romero seco, valor muy satisfactorio en relación a los valores encontrados en bibliografía y la composición del AER obtenido responde al quimiotipo β -pineno.

CAPÍTULO 3

Prototipo de destilación molecular. Ensayos preliminares.

En el presente capítulo se reflejan las actividades realizadas para ensamblar y poner a punto un prototipo de destilación molecular para su utilización en la obtención de fracciones de diferente composición a partir de aceite esencial de romero. Se informan las pruebas y acciones correctivas realizadas durante la puesta a punto del prototipo sobre aceite esencial de romero. Se presenta el procedimiento experimental a llevar a cabo para un adecuado funcionamiento del prototipo. Finalmente se muestra el primer conjunto de ensayos de destilación molecular que permitieron comprobar la factibilidad técnica de la utilización de esta operación para la aplicación en estudio.

3.1 Ensamblaje y puesta a punto de prototipo de destilación molecular

3.1.1 Introducción

Previamente al ensamblaje del equipamiento prototipo se realizaron simulaciones de la destilación molecular de aceite esencial de romero como un primer abordaje al conocimiento de la performance de esta operación sobre la aplicación en estudio. Para ello se utilizó el *software SPD-UNRC*, el cual diseña y/o simula la operación de

destilación molecular (Miró Erdmann, 2011). El mismo fue desarrollado en el grupo de trabajo *SIMAP* (Simulación Aplicada a Procesos), perteneciente al Departamento de Tecnología Química de la FI-UNRC (Facultad de Ingeniería - Universidad Nacional de Río Cuarto). Dicho simulador, desarrollado en el marco de una tesis de Maestría en Ciencias de la Ingeniería (FI-UNRC), contiene un modelo matemático basado en los fenómenos de transporte que tienen lugar en la operación a modelar, consistente en un sistema de ecuaciones algebraicas, diferenciales ordinarias y diferenciales parciales, el cual es resuelto utilizando un código computacional implementado en el entorno *MATLAB*. El simulador fue diseñado para tratar mezclas oleosas y fue validado con datos experimentales obtenidos por el grupo de trabajo *SIMAP* sobre un equipo *KDL4 – UIC*, donado a la Universidad Nacional de Río Cuarto, al grupo *GIDPO* (FI-UNRC), en el año 2002 por la Empresa Molinos Río de La Plata SA.

En base a los resultados obtenidos del simulador se pudo establecer un conjunto de condiciones operativas iniciales para llevar a cabo los ensayos preliminares de prueba de performance y establecimiento de rangos operativos de interés para estudiar y optimizar las variables operativas más influyentes.

Para este primer abordaje se colaboró en el ensamblaje del prototipo, el cual fue construido y parcialmente ensamblado en los talleres de la Empresa JMPedroni y Asociados, y el ensamble final fue realizado en el Laboratorio de Desarrollo a cargo del Dr. Soltermann, en la Facultad de Ciencias Exactas, de la UNRC.

3.1.2 Características del destilador molecular *KDL4-UIC* utilizado para validar el simulador

Los resultados del modelado, se contrastaron con datos experimentales obtenidos en un equipo de destilación molecular Modelo KDL4 de UIC-GmbH, construido en vidrio borosilicato. En la Figura 3.1 se muestra una imagen del equipo mencionado y en la Figura 3.2 un esquema del mismo.

Este equipamiento está provisto de un evaporador de película descendente de 4 dm² de área y un condensador interno de 2 dm² de área. La alimentación se realiza mediante una ampolla encamisada provista de una válvula de regulación e indicador de nivel y el destilado y residuo son recogidos en balones de vidrio. El vacío se realiza

mediante una bomba mecánica de anillo de aceite y una bomba difusora en serie. Cuenta además con un baño de aceite calefactor, un sistema de medición de presión para alto vacío, trampa de gases y motor del rotor agitador.

Sus especificaciones técnicas principales son:

- Presión de trabajo mínima: 5×10^{-5} bar
- Área de evaporación: 4 dm^2
- Área de condensación /trampa de vapores: 3 dm^2
- Capacidad máxima: 3 kg/h
- Temperatura máxima : $250 \text{ }^\circ\text{C}$
- Balones para residuo y destilado de borosilicato de 0,5 l de capacidad.



Figura 3.1: Imagen del equipo de destilación molecular KDL4-UIC.

Este equipo se encuentra actualmente disponible en la Planta Piloto, dentro de las instalaciones pertenecientes al Departamento de Tecnología Química, de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Río Cuarto, y está siendo utilizado actualmente en tareas de docencia, investigación y de servicios, por docentes integrantes de dicho departamento.

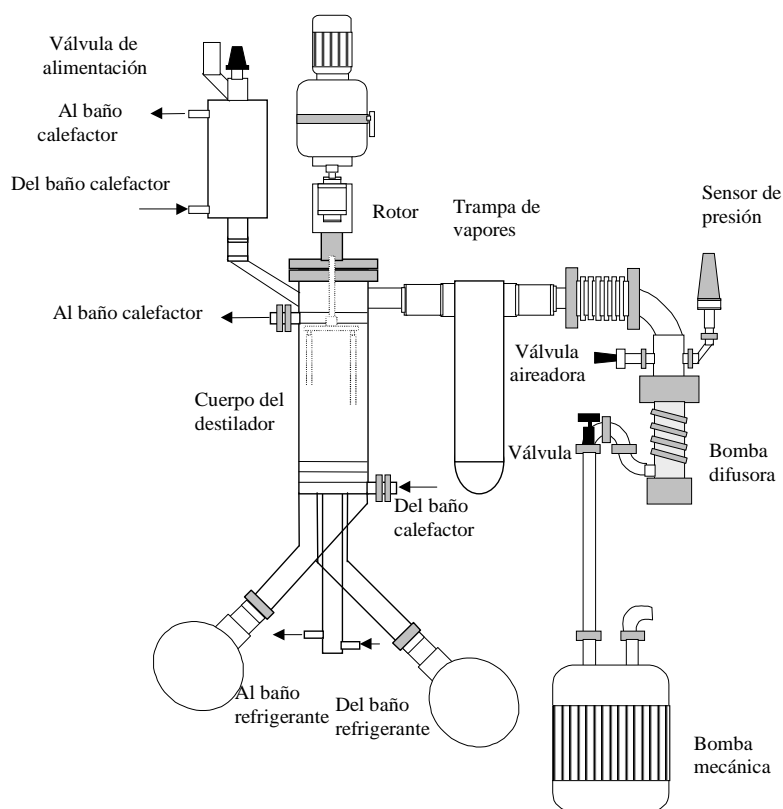


Figura 3.2: Esquema del equipo de destilación molecular KDL4-UIC.

3.1.3 Características del destilador molecular prototipo

En base a los resultados obtenidos de la aplicación del simulador a mezclas oleosas, se obtuvieron rangos de condiciones operativas necesarias para realizar el diseño del prototipo de destilador molecular, que permitió trabajar en la aplicación de estudio de la presente tesis, y también en otras aplicaciones típicas de esta operación.

El equipamiento diseñado posee una capacidad similar a la del KDL4-UIC, aprovechando la ventaja de que un destilador molecular de 4 dm^2 de área de evaporación, es lo suficientemente grande como para representar una escala banco para este tipo de operación, pero sin requerir grandes cantidades de muestra para los ensayos, lo cual es importante a los fines de los gastos de investigación.

Sin embargo, el cuerpo principal fue realizado en acero inoxidable AISI 316, dada la fragilidad del equipo UIC, que ocasiona roturas permanentes y dificultad de trabajo a alto vacío utilizando vidrio borosilicato. Esto permite disponer de un equipo más

robusto y eficiente en cuanto a que se pueden manejar mejor las fugas, tan importantes a altos niveles de vacío.

En la Figura 3.3 se observa el prototipo en dos etapas del montaje de los distintos elementos componentes.

A continuación se describen las condiciones operativas más relevantes a las que se concluye con el diseño, y posteriormente los elementos que permitirán llevar adelante esta operación con las condiciones de diseño especificadas.



Figura 3.3: Etapas del montaje del equipamiento prototipo.

3.1.4 Principales condiciones operativas y requerimientos de servicios

- Presión de trabajo mínima: 1×10^{-7} bar
- Área de evaporación: 4 dm^2
- Área de condensación: $4,5 \text{ dm}^2$
- Capacidad máxima: 3 kg/h
- Temperatura máxima: $250 \text{ }^\circ\text{C}$
- Balones para residuo y destilado de borosilicato de $0,5 \text{ l}$ de capacidad.
- Potencia: 2 kW
- Agua de enfriamiento: 500 l/h

3.1.5 Componentes del equipamiento prototipo del destilador molecular

En la Figura 3.4 se presenta un esquema del equipamiento prototipo de destilación molecular desarrollado, en el cual se observan sus distintos componentes, siendo la nomenclatura de los principales elementos la siguiente:

DCC4: Destilador de camino corto

BC1: Bomba de recirculación de aceite térmico

BSA 3: Bomba rotativa

BDF 40: Bomba difusora

TF 40: Trampa fría

CDD: Colector de destilado

CDR: Colector de residuo

VPFT: Calefactor de aceite térmico

CTF 100: Calefactor por termosifón

TP: Tanque pulmón

AL500: Alimentador

HCV: Válvula de alimentación

H8: Trompa de vacío

API: Indicador de Presión absoluta

MV: Válvula micrométrica

A continuación se describen las principales características de cada uno de los elementos principales del equipamiento prototipo.

1) DCC4: Destilador de camino corto, con camisa de calefacción con fluido térmico, de 4 dm^2 y condensador interno de $4,5 \text{ dm}^2$. En la Figura 3.5 se muestra el cuerpo del destilador molecular y el motor del rotor.

En la parte superior tiene un motorreductor comandado por un variador de velocidad. El eje atraviesa la tapa por un sello hidráulico. El líquido de sello sirve también de lubricante al cojinete y debe ser compatible con el líquido que se está destilando.

El rotor está formado por un “canasto” con rodillos giratorios que se recuestan sobre la superficie de calefacción por fuerza centrífuga. Está ligado al motorreductor comandado por el variador permitiendo trabajar a distintas velocidades, dentro del rango de 10 a 266 rpm.

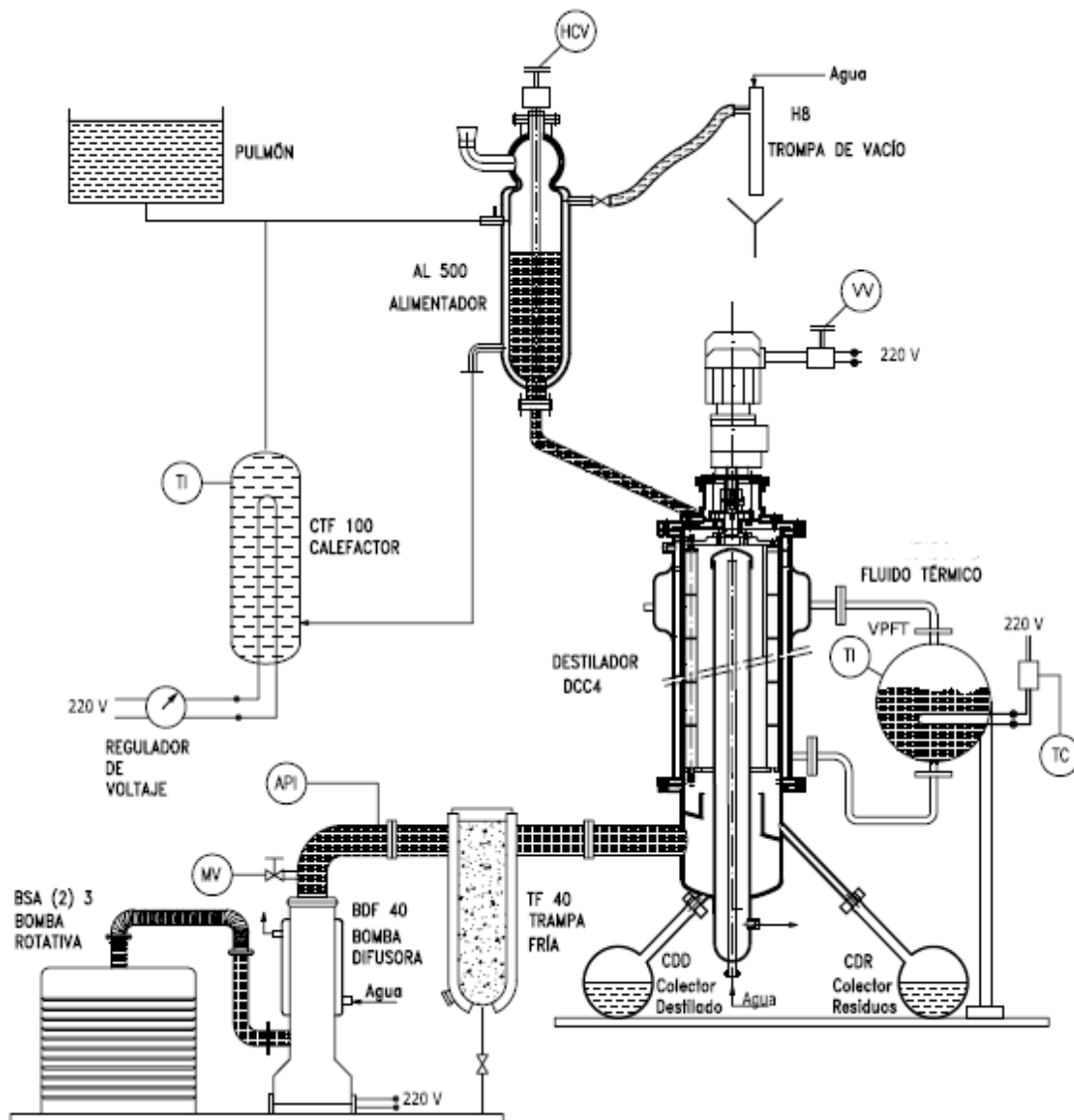


Figura 3.4: Esquema del equipamiento prototipo de destilación molecular desarrollado.

2) **CDD y CDR:** El destilado y el residuo se recogen en 2 balones de vidrio borosilicato, de 500 ml, los cuales se pueden observar en la Figura 3.6.



Figura 3.5: Cuerpo del destilador molecular y motor del rotor.



Figura 3.6: Balones colectores de destilado y residuo.

3) AL500: Alimentador de 500 ml de capacidad, con camisa para calefacción con agua y escala graduada de 0 a 500 ml. En la Figura 3.7 se presenta la imagen de este elemento.

En la parte superior tiene un dispositivo, con una rueda graduada en 100 divisiones, cada una de las cuales corresponde a una elevación de 0,005 mm del tapón que regula la descarga. Tomando el tiempo en el que el nivel baja un determinado número de divisiones de la escala en volumen, se puede determinar el caudal.

El alimentador puede trabajar a presión atmosférica o a vacío. En este último caso, es necesario cerrar la boca de entrada con el tapón esmerilado y conectar la salida superior lateral a una trompa de vacío de laboratorio. Abriendo el agua a la bomba, se producirá una disminución de la presión, que junto al calentamiento del producto harán que el alimentador trabaje como desaireador y deshidratador, eliminando tanto el aire disuelto como la humedad contenida en la muestra. Hay que advertir que, operando a vacío, el caudal que ingresa no es el mismo que cuando se opera a presión atmosférica, pues la diferencial actuante sobre la apertura del tapón, no es igual.

La eliminación del aire y del vapor en esta etapa, alivia el sistema de vacío y, lo más importante, evita la oxidación del producto a elevada temperatura.

El alimentador puede trabajar en forma continua o discontinua. En forma continua lo hace dejando gotear el líquido de carga desde el exterior y manteniendo el nivel constante. En forma discontinua, se carga y se deja gotear mientras baja el nivel de líquido.



Figura 3.7: Alimentador del destilador molecular, con camisa para calefacción con agua y escala graduada.

4) CTF100: Calefactor de acero inoxidable, con resistencia eléctrica variable para hacer circular, por termosifón, agua caliente en el alimentador AL500.

Posee una resistencia calefactora de 250 W. La Figura 3.8 muestra una fotografía del cuerpo que contiene dicha resistencia.



Figura 3.8: Cuerpo contenedor de resistencia eléctrica para la calefacción por termosifón.

5) VPFT: Tanque contenedor de fluido térmico, con fuente de calor eléctrica monofásica, 220 V, potencia 1 kW, comandado automáticamente por un Triac y una termorresistencia. Cuenta con un termómetro y una válvula de seguridad. El indicador de temperatura del fluido térmico permite apreciar la temperatura de destilación, pues la caída a través de la pared metálica es de 1,5 a 2°C. Capacidad del recipiente: 7 lt. Una fotografía de este elemento se presenta en la Figura 3.9.

Además, se mide la temperatura de descarga del residuo mediante un termómetro digital con sensor de acero inoxidable, vaina de 133 mm (Figura 3.10).

6) TF40: Trampa fría, para 350 ml de refrigerante. Material: acero inoxidable AISI 304. El refrigerante puede ser nitrógeno líquido o hielo seco suspendido en alcohol etílico de 96%. La trampa debe permanecer tapada para mayor duración del refrigerante, pero no herméticamente para permitir su evaporación. El grifo inferior permite retirar el refrigerante y la tapa con *O-ring*, el condensado. La trampa fría se puede observar en la Figura 3.11.



Figura 3.9: Recipiente pulmón de aceite térmico.



Figura 3.10: Medición de la temperatura del residuo con termorresistencia en línea.



Figura 3.11: Trampa fría para la retención de vapores del destilador.

7) BDF40: Bomba difusora de $40 \text{ m}^3/\text{h}$ de capacidad, presión de aspiración $< 0,1 \text{ Pa}$ (10^{-3} mbar), presión final $3 \times 10^{-4} \text{ Pa}$ ($3 \times 10^{-6} \text{ mbar}$). Contrapresión crítica: 30 Pa ($0,3 \text{ mbar}$). Potencia (a 220 V): 220 W . Tiempo de calefacción: 10 a 15 min. Nivel de carga de silicona: mínimo 10ml, normal 15ml, máximo 20ml; tipo: *Dow Corning 704* o similar. La Figura 3.12 muestra una imagen de la bomba difusora.



Figura 3.12: Bomba difusora con sensor de presión de alto vacío.

8) BSA3: Bomba de sello de aceite de dos etapas, capacidad $3 \text{ m}^3/\text{h}$, presión de aspiración: 3 Pa ($0,03 \text{ mbar}$), presión final $7 \times 10^{-2} \text{ Pa}$ ($7 \times 10^{-4} \text{ mbar}$), potencia absorbida por el motor: $0,18 \text{ kW}$. Con válvula de gas de balasto. Verificación de nivel de aceite en indicador de nivel. La Figura 3.13 muestra dos imágenes de la bomba de sello de aceite; en la primera puede apreciarse su ubicación respecto al resto del equipo y en la segunda se observa el medidor de nivel de aceite de la misma.

9) API: Indicador de presión absoluta. Presómetro analógico, circuito puente, con sensor a termopila, de $9,5 \text{ mm}$ de diámetro, $2,5 \text{ m}$ de cable, rosca $1/8 \text{ plg NPT}$, indicador del tipo digital, rango $0-1,3 \cdot 10^{-3} \text{ bares}$. La Figura 3.14 muestra la ubicación del indicador de presión.

Para los ensayos a menores vacíos, entre $0,01$ y $0,2 \text{ bares}$, se utiliza un presómetro de Bennert.



Figura 3.13: Ubicación de la bomba mecánica y de la de aceite térmico, e indicación de nivel de la bomba mecánica.



Figura 3.14: Indicador de presión de alto vacío.

10) MV: Válvula micrométrica de ajuste de la presión (Figura 3.15). DN6, conexión KF10, volante graduado en 60 divisiones, rango 0 a 0,1 l/s.



Figura 3.15: Válvula micrométrica para regulación de presión.

11) **BC1:** Bomba de recirculación de aceite térmico, de hierro fundido tipo a engranaje, empaquetadura de vitón, caudal 8 m³/min, altura de impulsión: 5 m. Este elemento se muestra en la Figura 3.16.



Figura 3.16: Imagen superior de la bomba de aceite térmico.

3.1.6 Pruebas post-montaje del equipo prototipo

Luego del montaje, fueron llevadas a cabo diversas pruebas con el fin de verificar el buen desempeño del equipamiento y, de ser necesario, realizar medidas correctivas.

Determinación del tiempo de calentamiento del aceite térmico

Se cargó el tanque pulmón con aceite térmico *Thermia B* de *Shell*. Se analizó la altura del aceite térmico con la bomba de recirculación en funcionamiento, corroborando que el nivel de aceite en el tanque esté por encima de la resistencia eléctrica. Se determinó la necesidad de reemplazar el sensor de temperatura interno debido a que presentó diferencias con las temperaturas medidas con la termorresistencia frontal y con mediciones realizadas con termocuplas por el acceso superior (en el sitio en el que normalmente se encuentra la válvula de seguridad)

Las pruebas de calentamiento, para determinar el tiempo de calentamiento y la sobrepresión medida en el tanque arrojaron los resultados mostrados en las Figuras 3.17 y 3.18.

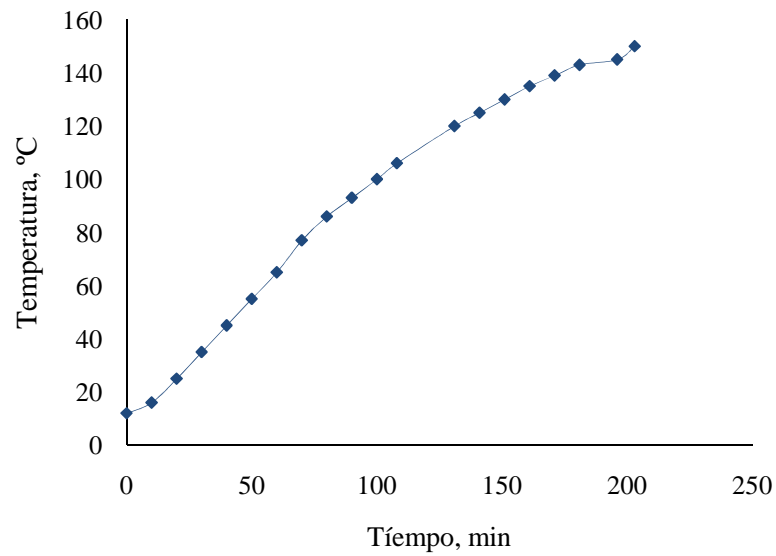


Figura 3.17: Variación de la temperatura del aceite térmico en función del tiempo.

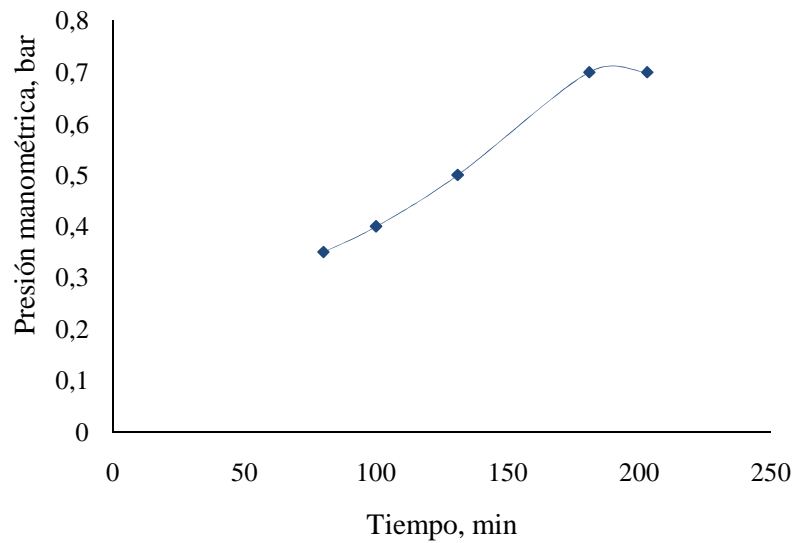


Figura 3.18: Variación de la presión manométrica dentro del tanque de fluido calefactor durante el calentamiento.

La comparación entre los valores de máxima potencia y mínima potencia de la resistencia de calefacción mostró los límites posibles de tiempo de calentamiento para las condiciones externas imperantes. En la Figura 3.19 se muestran estos rangos.

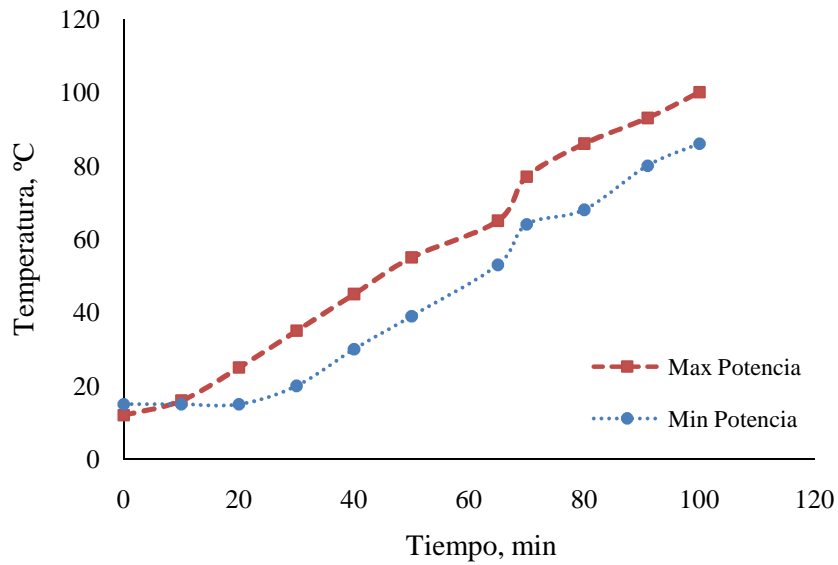


Figura 3.19: Temperatura del fluido calefactor en función del tiempo para máxima y mínima potencia de la resistencia de calefacción.

Las pérdidas resultaron de menor significatividad cuando los ensayos fueron realizados en verano, donde las condiciones imperantes en el lugar de trabajo correspondieron a valores mayores de temperatura. En la Figura 3.20 se muestra la comparación de dos pruebas realizadas en ambas estaciones.

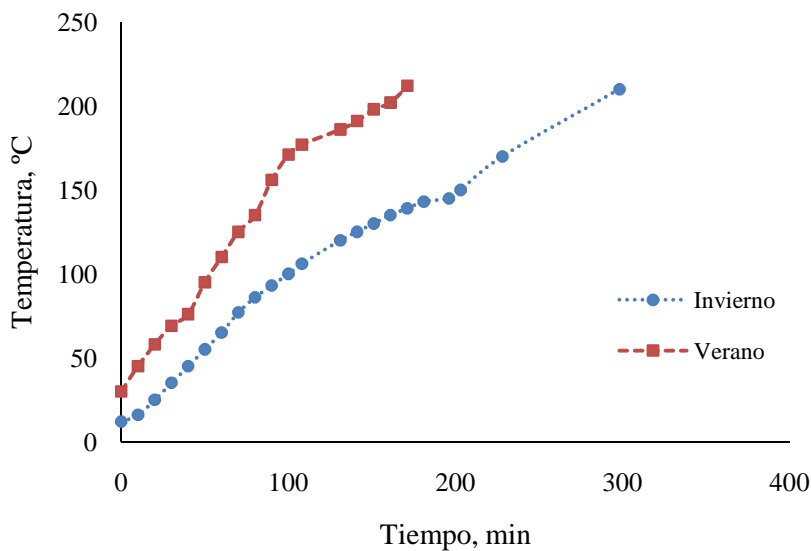


Figura 3.20: Pruebas de calentamiento de fluido calefactor realizadas en verano e invierno.

Pureza y cantidad adecuada del aceite de la bomba difusora

Se carga la bomba difusora con aceite siliconado *Dow Corning 704*. La cantidad necesaria es de 10 a 20 cm³ siendo la óptima de 15 cm³.

El amperaje adecuado de corriente a la resistencia es de 1 A.

Tiempo necesario para alcanzar el vacío requerido

En la Figura 3.21 se muestra la evolución de la presión con el tiempo. Al comienzo sólo está encendida la bomba de sello de aceite y a los 48 min se prendió la bomba difusora, notándose un pequeño aumento inicial de la presión (hasta que la segunda bomba entró en régimen). Para alcanzar el máximo vacío, la intensidad de corriente en la bomba difusora debe regularse en 1 A, ya que en pruebas realizadas con 0,5 A, la corriente no fue suficiente.

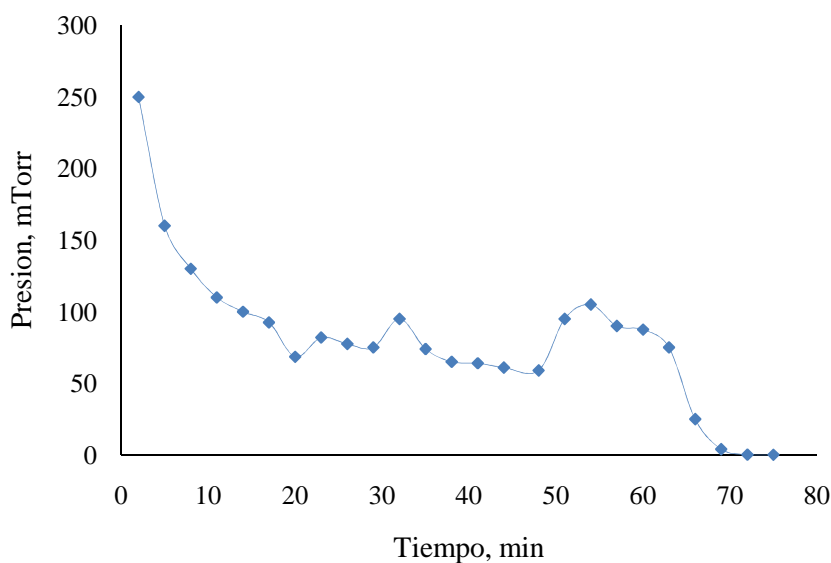


Figura 3.21: Evolución de la presión durante la prueba de vacío.

Agua de calentamiento de la alimentación

Se realizaron ensayos para corroborar la capacidad de calefacción del agua de calentamiento de la alimentación, probando a diferentes potencias de la resistencia eléctrica. Se tomaron dos medidas de la temperatura, una en línea en cercanías de la

resistencia eléctrica que calienta el agua y otra en el tanque pulmón, que se encuentra por encima de la resistencia. Se compararon estas dos mediciones de temperaturas, dando lugar a las Figuras 3.22 y 3.23.

Es claro que para potencias inferiores a $5/8P_{\text{máx}}$, la potencia no es suficiente para mantener la temperatura, alrededor de rangos típicos de calentamiento.

La diferencia de temperatura en el circuito no es sustancialmente diferente como puede apreciarse en la Figura 3.23. Utilizando la resistencia en $3/8P_{\text{máx}}$, se logra una temperatura de $27\text{ }^{\circ}\text{C}$, la cual resulta adecuada para la aplicación de la presente tesis.

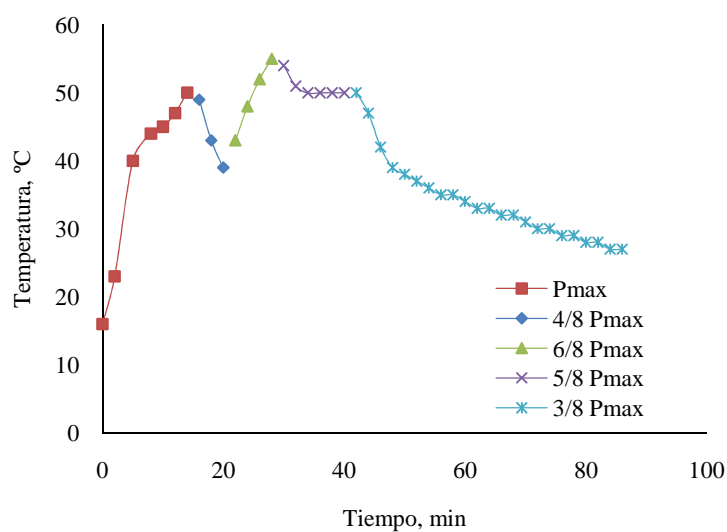


Figura 3.22: Evolución de la temperatura para diferentes niveles de potencia de la resistencia eléctrica.

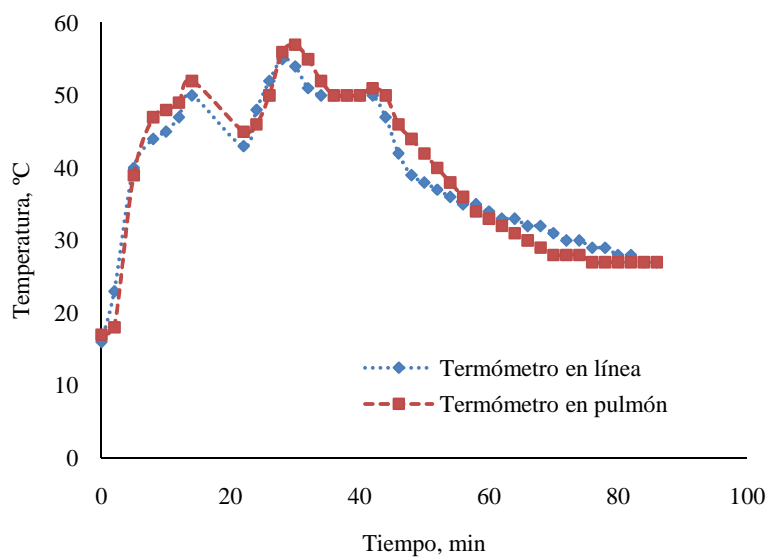


Figura 3.23: Comparación de la evolución de la temperatura en diferentes puntos del circuito.

Prueba de la trompa de vacío

Se comprobó el nivel de vacío alcanzado utilizando dos configuraciones diferentes para el agua utilizada en la trompa de vacío: agua corriente y agua impulsada por una bomba centrífuga. Con presión de agua de tanque se alcanzó una presión de 0,37 bar y con agua a la presión de una pequeña bomba centrífuga (600 l/h a 20 m) se alcanzaron 0,04 bar. Esta última opción resultó más adecuada para el tipo de operación.

Calibración de la velocidad del rotor

El motor del rotor es de 24 V y permite variar el voltaje y de esa manera variar las revoluciones por minuto. Se determinaron las rpm a máximo voltaje, determinando que corresponden a 266 rpm. Dada la proporcionalidad de la velocidad con el voltaje, a 12 V la velocidad será de 133 rpm. Esta proporcionalidad se mantiene para cualquier otro valor al que se quiera regular la velocidad del rotor dentro de este rango.

Prueba con diferentes refrigerantes en la trampa

Respecto del refrigerante de la trampa fría es primordial que la misma funcione bien ya que de lo contrario se contamina la silicona de la bomba difusora y el aceite de la bomba mecánica. La contaminación de estos aceites perjudica no sólo la vida útil de las bombas, sino que reduce considerablemente el rendimiento de las mismas. El refrigerante a utilizar depende de la presión de operación a la que va a destilar y de los compuestos volátiles que contenga el material a ser procesado, los cuales deben ser retenidos para evitar los inconvenientes mencionados. Para la elección del refrigerante se debe estimar la temperatura de saturación de los componentes a bajas presiones.

Las opciones de refrigerantes a utilizar son básicamente tres:

- Nitrógeno líquido (-195 °C), para alto vacío.
- Hielo seco en suspensión de alcohol (-78 °C), para vacíos intermedios.
- Hielo común con sal (hasta -21 °C), para bajo vacío.

Una última opción es la de usar un baño criogénico a -30 °C, que resulta suficiente en la mayoría de las aplicaciones. Para los ensayos de esta tesis, si bien se experimentó

con la tercera alternativa, se determinó la necesidad de usar nitrógeno líquido dada la alta volatilidad de algunos componentes de los aceites esenciales, que contaminan el aceite de la bomba difusora y de la mecánica.

Otras pruebas llevadas a cabo

- Prueba del baño criogénico, para enfriamiento del condensador y de la bomba difusora, con soluciones de distintas concentraciones de dietilenglicol y alcohol.
- Pruebas para dar solución a problemas con el flujo de alimentación. Se observó que los *O-ring* en el ingreso del alimentador se deterioraban con el lavado con acetona, lo cual se corrigió con el lavado con etanol. Como medida preventiva, dichos *O-ring* se cambian periódicamente ya que si se deforman o deterioran se origina un flujo de alimentación variable y difícil de controlar.
- Fugas de agua del sistema de refrigeración, para lo cual se realizaron ensayos y correcciones hasta total aislación.
- Puntos posibles de fuga del sistema sometido a vacío, compuesto por el destilador y los recipientes de alimentación del material a procesar y de recepción de los productos. Básicamente se resolvieron con algunos acoples y con el agregado de grasa de vacío en diferentes puntos de unión.
- Verificación de las pérdidas de calor del sistema de fluido calefactor. Se optimizó el tiempo de calentamiento, analizando la influencia del momento de encendido de la bomba de recirculación de aceite térmico. Para aplicaciones en las que se requieren altas temperaturas de operación, es conveniente dejar calentar el aceite hasta altas temperaturas, recirculándolo sólo por momentos para evitar que se queme. Una vez alcanzada una temperatura cercana a la necesaria, recircular el aceite continuamente y terminar el calentamiento con el fluido en movimiento. De esta forma se consigue un tiempo de calentamiento menor a si todo el proceso se lleva a cabo con recirculación continua.
- Ensayos para comprobar la funcionalidad del prototipo. Se realizaron pruebas de separación con distintos materiales: aceites esenciales de romero, orégano, limón, aceite de pescado, aceite de soja, oleínas de soja y destilados de desodorización. Esto permitió

corroborar que la separación es factible en todos estos materiales, cambiando las condiciones operativas, principalmente la temperatura de evaporación y la presión de operación.

3.2 Procedimiento experimental para la realización de ensayos en el prototipo

Se ha desarrollado una metodología de trabajo experimental para el destilador molecular de película descendente, procedimiento que será utilizado en todos los ensayos de destilación molecular de esta tesis. A continuación se enumeran las acciones que conforman dicho procedimiento.

- 1- Asegurarse que el sistema está aislado y la válvula micrométrica cerrada.
- 2- Llenar la cavidad del sello líquido del rotor con el aceite adecuado.
- 3- Cerrar el tapón del alimentador.
- 4- Encender el baño térmico para el fluido de enfriamiento.
- 5- Poner en marcha la bomba rotativa, con la válvula de balasto parcialmente abierta y esperar que se estabilice la presión. Llegará a presiones entre 5×10^{-5} a 1×10^{-4} bar.
- 6- Encender la bomba difusora y hacer circular agua de enfriamiento por la serpentina que la encamisa. Esperar 10 a 15 minutos para que entre en régimen.
- 7- Cargar el alimentador AL500 con el líquido a destilar y cerrar con el tapón esmerilado.
- 8- Abrir el agua a la trompa de vacío y aspirar el aire del alimentador. Esperar que la presión llegue a 0,04-0,06 bar. Esta es la presión normal de operación del alimentador para un buen despojamiento de aire y humedad. Esto demora aproximadamente 10 min.
- 9- Encender la resistencia del fluido calefactor. Ajustar el Triac a la temperatura deseada.
- 10- Hacer circular agua caliente en el alimentador encendiendo la resistencia del calefactor CTF100 para calentar la carga, ajustando la potencia para lograr la temperatura deseada. Esto favorece la desgasificación.
- 11- Cargar la trampa fría con refrigerante.

- 12- Ajustar la presión en el destilador con la válvula micrométrica.
- 13- Encender el motor del rotor.
- 14- Cuando la temperatura del fluido térmico, del fluido de enfriamiento del condensador y la presión en el destilador llegan al valor deseado, se puede iniciar la alimentación, actuando sobre la perilla graduada.
- 15- Controlar el caudal midiendo el tiempo que transcurre entre dos divisiones. El área neta del alimentador es 19 cm^2 .
- 16- Al cabo de unos minutos comenzará a fluir destilado y residuo a los balones receptores. Si sólo se recoge residuo es porque hay algún problema en la destilación, por ejemplo: baja temperatura del fluido térmico o presión de destilación alta.
- 17- Para parar el equipo, se procede en sentido inverso. Cortar la alimentación y apagar la resistencia del generador térmico.
- 18- Apagar la resistencia de la bomba difusora.
- 19- Dejar enfriar el destilador bajo vacío.
- 20- Cuando el equipo está frío, se procede a apagar el baño térmico de enfriamiento y se puede romper el vacío con la válvula micrométrica. No debe incorporarse aire con el equipo caliente para evitar oxidación y ensuciamiento.
- 21- Recién cuando se ha roto el vacío se puede parar la bomba mecánica de vacío. Si se hace antes puede pasar el aceite de sello de la bomba al sistema.

3.3 Ensayos preliminares de destilación molecular para la obtención de fracciones de aceite esencial de romero

3.3.1 Objetivo

El objetivo planteado para esta etapa de la tesis fue comprobar la factibilidad de obtener fracciones mediante destilación molecular, partiendo de aceite esencial de romero, y utilizando varias etapas en serie, lograr fracciones de mayor concentración en algunos componentes mayoritarios que permitan elaborar hipótesis sobre diferentes potenciales antioxidantes de dichas fracciones.

3.3.2 Materiales y métodos

Para cumplir el objetivo planteado se realizaron pruebas de barrido de las principales variables operativas, determinando rangos de operación adecuados de trabajo, analizando cromatográficamente la composición y utilizando la técnica del radical DPPH• para seguir las variaciones en capacidad antioxidativa. Con los primeros ensayos se analizó la influencia de dos variables operativas importantes como presión de operación (P) y flujo de alimentación (F) sobre el porcentaje de destilado y posteriormente sobre su composición. Luego se estudió la influencia del número de etapas en serie sobre la concentración en diferentes componentes y el poder antioxidante de las fracciones obtenidas, específicamente se estudiaron 3 etapas en serie.

Materia prima

El aceite esencial de romero utilizado fue donado por la empresa PLATARIO S.A. El mismo corresponde a la especie *R. officinalis*, cosecha marzo de 2010, la cual fue producida en Barreal, Calingasta, provincia de San Juan, 31° 40' latitud Sur, 69° 29' latitud Oeste, a 1650 m sobre el nivel del mar.

Composición de extractos concentrados

Las composiciones de las fracciones de AER obtenidas a partir de la operación de destilación molecular fueron determinadas cromatográficamente mediante un equipo de cromatografía gaseosa Hewlett Packard HP 6890 con detector de ionización de llama (FID) y columna INNOWax. El programa de temperatura del horno fue: 2 °C/min desde 60 °C hasta 250 °C, permaneciendo 10 minutos a 250 °C. El flujo del gas carrier (N₂) fue de 0,7 ml/min. La temperatura del inyector fue de 250 °C y la temperatura del detector 350 °C. La muestra se disolvió en hexano y el volumen inyectado fue 1µl. La identificación de los componentes presentes en las muestras se realizó por comparación de los tiempos de retención de los picos de la muestra con el tiempo de retención de los

patrones. Las concentraciones relativas fueron calculadas de acuerdo al área de picos dada por el integrador HP3398A.

Poder antioxidante de extractos concentrados

Para evaluar la actividad antioxidante del aceite esencial de romero y las fracciones obtenidas en la destilación molecular, se seleccionó un método basado en la capacidad de captación de radicales libres, utilizando el radical libre DPPH• ya que en presencia de un antioxidante se reduce a DPPH-H disminuyendo su absorbancia espectrofotométrica. La técnica utilizada se basó en el método utilizado por Brand-Williams (1995) con modificaciones. Se prepararon distintas soluciones en hexano, de AER y de los destilados y residuos obtenidos de la destilación molecular, 2 ml de estas soluciones de distintas concentraciones (0,1 mg/ml a 50 mg/ml) fueron adicionadas a 2 ml de la solución de DPPH• en hexano (aproximadamente 0,9 UA – unidades de absorbancia - a 515 nm). El tiempo de reacción se determinó siguiendo la reacción de aceite esencial de romero y DPPH• en hexano, se midió la disminución de la absorbancia de la muestra reaccionante cada 15 segundos hasta alcanzar valores constantes, determinándose este punto como “*plateau*” de la reacción. Se graficó la absorbancia de la muestra reaccionante en función del tiempo expresado en segundos, la muestra reaccionante tuvo una concentración de aceite esencial de romero en solución de DPPH• de 12,9 mg/ml. El tiempo de reacción entre cada muestra evaluada y la solución de DPPH• fue de 2 horas por considerar que la reacción al cabo de ese tiempo alcanzó el *plateau*, esto puede observarse en la Figura 3.24, donde se grafica la absorbancia de la muestra reaccionante en función del tiempo expresado en segundos. La absorbancia fue medida a temperatura ambiente en un espectrofotómetro JascoV-630. El blanco consistió en hexano y la solución de control consistió en 2 ml de la solución de DPPH• y 2 ml de hexano.

La capacidad de captación de radicales libres fue calculada de acuerdo a:

$$\% \text{ CRL: } ((A_C - A_M)/A_C) * 100$$

Donde A_M es la absorbancia de la solución que contiene muestra antioxidante y A_C es la absorbancia de la solución de control.

Para evaluar la capacidad de captación de radicales libres se definió el valor EC_{50} que es la cantidad de muestra que disminuye la concentración de $DPPH^{\bullet}$ inicial al 50 % expresada en mg/ml. Un valor alto de EC_{50} indica una capacidad de captación de radicales libres débil mientras que un bajo valor de EC_{50} indica que tiene una alta capacidad de captación de radicales libres. En la Figura 3.25 puede observarse la ubicación gráfica del valor de EC_{50} , en la misma se grafica el % CRL en función de la concentración de la muestra.

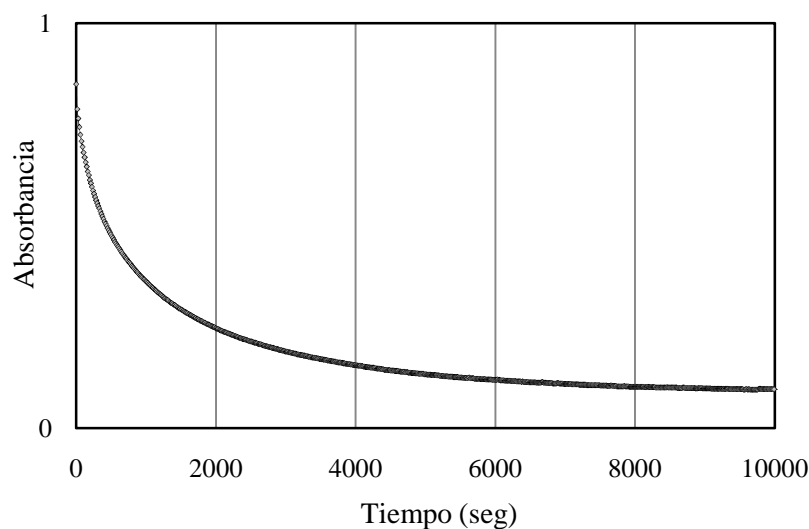


Figura 3.24: Absorbancia de la muestra de aceite esencial de romero en hexano de concentración de 12,9 mg/ml en función del tiempo

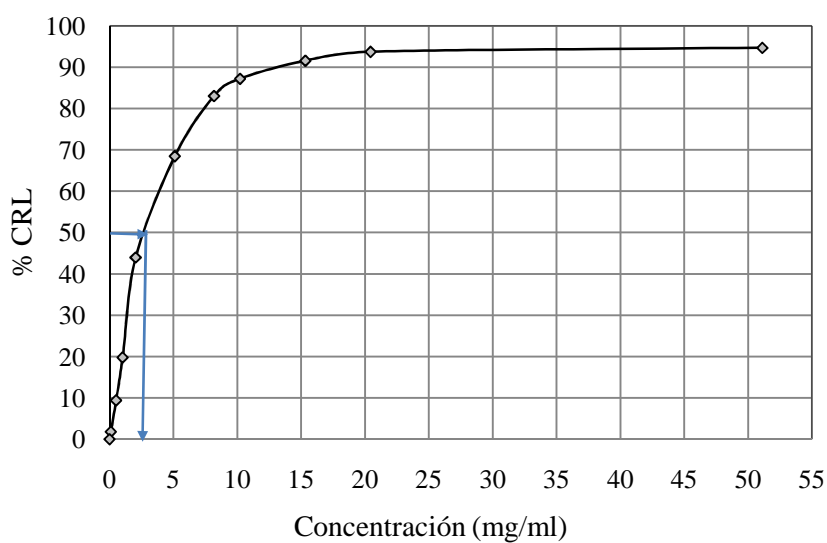


Figura 3.25: Determinación del valor de EC_{50}

3.3.3 Resultados

Ensayos para evidenciar la factibilidad técnica de evaporación

En estos primeros ensayos se fijaron algunas variables de operación menos influyentes en la cantidad a destilar, con valores típicos tomados de bibliografía y de ensayos de puesta a punto del prototipo; así la temperatura del condensador se mantuvo constante a 2 °C, la temperatura de alimentación se mantuvo constante a 25 °C, la temperatura de evaporación fue de 27 ± 1 °C y la velocidad del rotor fue de 200 rpm. El objetivo de esta experiencia consistió en alcanzar la evaporación del 20 al 80 % del aceite esencial de romero alimentado con el fin de obtener fracciones con distintas concentraciones en los componentes principales. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1: Resultados de ensayos de destilación molecular (Veloc. rotor: 200 rpm, $T_{\text{evap}}=27^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{cond}}=2^{\circ}\text{C}$).

Nº ensayo	Presión (bar)	Flujo de alimentación (ml/min)	% Destilado	% Residuo
I	0,105	0,89	22,30	77,70
II	0,039	1,13	44,90	55,10
III	0,079	0,83	54,20	45,80
IV	0,013	1,06	80,22	19,78

Al analizar la cantidad de destilado y de residuo obtenido en cada uno de los cortes procesados por destilación molecular, se evidencia la factibilidad técnica de obtener distintas cantidades de destilado y residuo al trabajar a diferentes presiones operativas.

En la Tabla 3.2 se muestran los resultados cromatográficos de los 5 compuestos principales presentes en los destilados y residuos de estas 4 experiencias. Los componentes están ordenados por orden de aparición en el cromatograma.

Tabla 3.2: Resultados de análisis cromatográfico a las muestras de destilado (D) y residuo (R) en cada experiencia de destilación molecular (I, II, III y IV).

	Alimentación	Experiencia I		Experiencia II		Experiencia III		Experiencia IV	
	F	DI	RI	DII	RII	DIII	RIII	DIV	RIV
% obtenido	100,00	22,30	77,70	44,90	55,10	54,20	45,80	80,22	19,78
Compuestos	Composición (% p/p)								
α-pineno	12,31	22,89	9,28	18,86	6,97	18,05	5,51	13,21	8,66
canfeno	4,10	6,56	3,40	6,16	2,42	5,36	2,61	4,49	2,52
mirceno	23,70	31,24	21,54	30,08	18,50	28,51	18,00	27,60	7,89
1,8-cineol	19,22	10,07	21,84	21,07	17,71	17,00	21,84	22,34	6,57
alcanfor	11,75	5,45	13,55	6,34	16,16	5,61	19,02	12,17	10,05

En las Figuras 3.26 a) y 3.26 b) se muestran los componentes principales en función del % D obtenido a partir de los ensayos a distintas condiciones operativas.

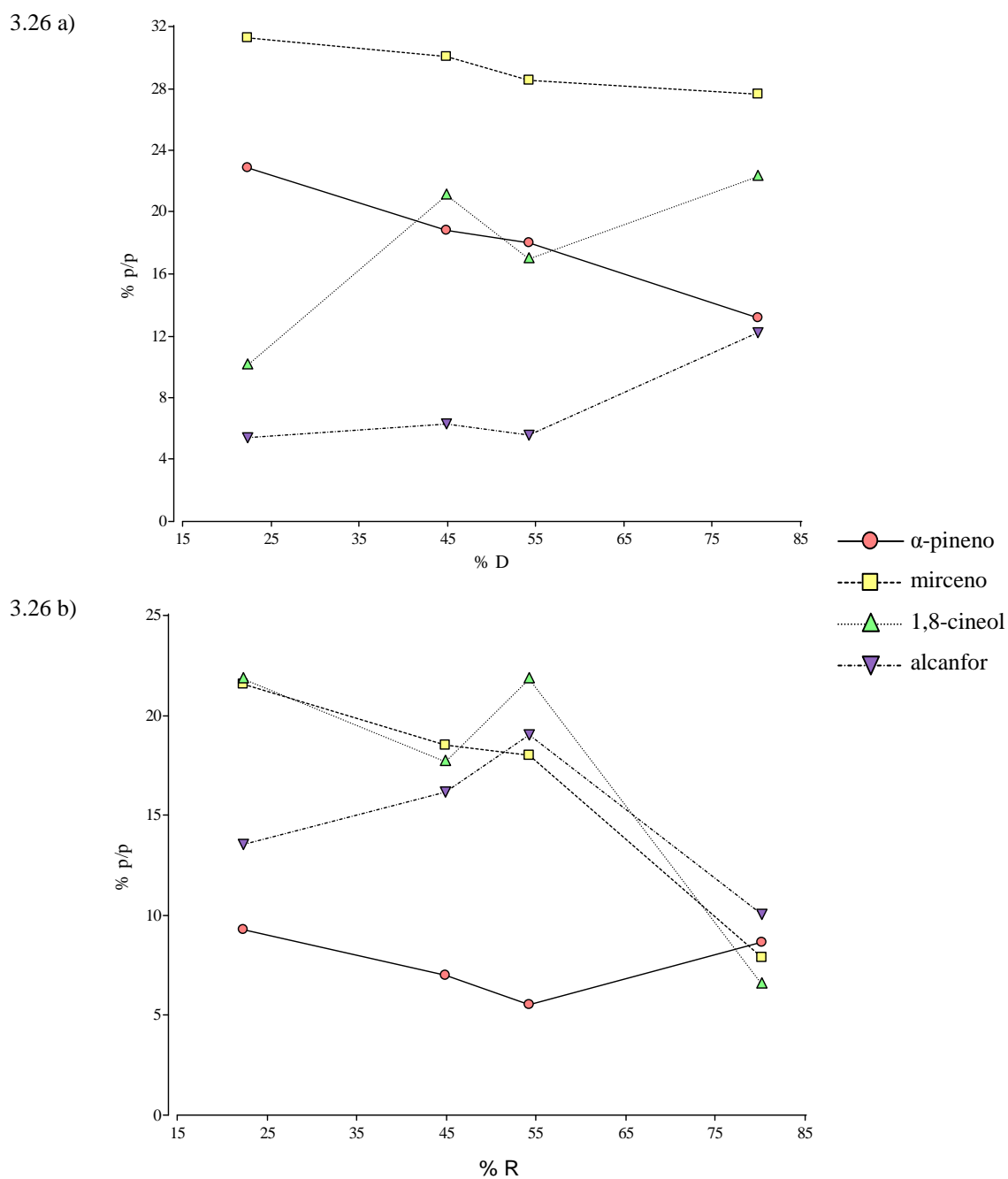


Figura 3.26: Composición en % p/p de los diferentes compuestos en cada etapa en función del porcentaje de destilado obtenido para los destilados (D) 3.26 a) y para los residuos (R) 3.26 b).

Al analizar las gráficas de las Figuras 3.26 a) y 3.26 b), se destaca que el 1,8-cineol y el alcanfor comienzan a concentrarse en el destilado a altos porcentajes de destilado. Esta tendencia se corrobora con el comportamiento de los residuos. El alcanfor presenta un máximo en la figura del 19 % en los residuos, mostrando claramente que a bajos porcentajes de evaporación se concentra y a altos se diluye.

En función de las concentraciones y la masa de cada fracción obtenida en cada ensayo, se determinaron los rendimientos porcentuales (η) e índices de concentración (IC) referidos a la alimentación de aceite de romero de acuerdo a lo siguiente:

$$\eta_i^j = \frac{x_i^j w^j}{x_i^F w^F} 100 \quad (3.1)$$

$$IC_i^j = \frac{x_i^j - x_i^F}{x_i^F} 100 \quad (3.2)$$

Donde:

η_i^j : rendimiento porcentual del componente i, en la corriente j;

IC_i^j : índice de concentración del componente i, en la corriente j;

i: componentes identificados;

j: destilado (D), residuo (R);

w^j : peso, en g, de la corriente j;

x_i^j : composición del componente i, en la corriente j;

x_i^F : composición del componente i, en el aceite de romero alimentado;

w^F : peso, en g, de la corriente de alimentación.

En la Tabla 3.3 se muestran los valores de rendimientos porcentuales e índices de concentración para el conjunto de ensayos mostrados en la Tabla 3.1.

Los índices de concentración y rendimientos de los componentes mayoritarios, mostraron ser dependientes de las cantidades relativas de residuo y destilado obtenidas en la operación de destilación molecular.

Tabla 3.3: Rendimientos porcentuales (η) e índices de concentración (IC) de los componentes principales en los destilados (D) y residuos (R) de las diferentes experiencias de destilación molecular (I, II, III y IV).

		DI	RI	DII	RII	DIII	RIII	DIV	RIV
α -pineno	η_A	41,46	58,57	68,79	31,21	79,49	20,51	86,08	13,92
	CI _A	0,86	-0,25	0,53	-0,43	0,47	-0,55	0,07	-0,30
mirceno	η_B	29,40	70,61	56,99	43,01	65,21	34,79	93,42	6,58
	CI _B	0,32	-0,09	0,27	-0,22	0,20	-0,24	0,16	-0,67
1,8-cineol	η_C	11,68	88,30	49,22	50,78	47,95	52,05	93,24	6,76
	CI _C	-0,48	0,14	0,10	-0,08	-0,12	0,14	0,16	-0,66
alcanfor	η_D	10,35	89,64	24,23	75,77	25,86	74,14	83,09	16,91
	CI _D	-0,54	0,15	-0,46	0,38	-0,52	0,62	0,04	-0,14

Al analizar los rendimientos porcentuales en los destilados de las experiencias I, II y III se observa que, en general, los compuestos que tienen un mayor rendimiento, (compuestos más volátiles) son los que tienen menor tiempo de retención en la columna cromatográfica. Claramente el alcanfor pasa mayoritariamente al destilado en la última experiencia, a diferencia de 1,8-cineol que se divide ya en las experiencias de destilación con similares cantidades de destilado y residuo, mientras mirceno y α -pineno principalmente se van al destilado.

Los índices de concentración negativos indican que en esa corriente el componente se diluye respecto de la alimentación. Se evidencia que α -pineno y mirceno se concentran en el destilado y alcanfor en el residuo de las primeras 3 pruebas.

Con esta etapa de experiencias se concluye que la operación de destilación molecular es factible de ser utilizada para separar y concentrar los componentes del aceite esencial de romero.

Ensayos para determinar la influencia de variables de la operación de destilación molecular sobre la cantidad de destilado y su composición.

Se realizó un análisis para evaluar la correlación existente entre el porcentaje de destilado obtenido (% D) y las variables presión de operación (P) y flujo de alimentación (F) utilizando el entorno de programación Matlab. Los datos experimentales se aproximaron con una ecuación polinomial de grado 2.

En la Tabla 3.4 se muestran los ensayos realizados para determinar la influencia de las variables presión de operación y flujo de alimentación sobre la cantidad de destilado y residuo obtenido expresadas como porcentaje de cantidad de destilado y residuo en relación de la cantidad alimentada.

Del análisis de las condiciones operativas se llegó a determinar una correlación entre la cantidad de destilado obtenida (% D) obtenida en función de la presión de operación (P) y el flujo de alimentación (F). En la Figura 3.27 se muestra la superficie generada mediante el ajuste y los datos experimentales. La correlación resultado del ajuste se presenta a continuación:

$$\% D = 550 - 4,015 * P - 630,3 * F + 0,006526 * P^2 + 2,256 * P * F + 190,6 * F^2$$

La aproximación ofrece muy buenos resultados, ya que el R^2 del ajuste es 0,9959.

Tabla 3.4.: Experiencias analizadas para determinar la influencia de condiciones operativas en la operación de destilación molecular (Veloc. rotor: 200 rpm, $T_{\text{evap.}}$: 26 ± 1 °C, $T_{\text{cond.}}$: 2°C).

Nº ensayo	Presión (Torr)	Flujo de alimentación (ml/min)	% D	% R
1	78,8	0,89	22,30	77,70
2	59,2	0,83	54,20	45,80
3	29,2	1,13	44,90	55,10
4	9,8	1,06	80,22	19,78
5	20,0	1,38	25,20	74,80
6	30,0	1,52	21,40	78,60
7	45,0	1,15	12,30	87,70
8	45,0	1,18	19,88	80,12
9	45,0	1,10	19,46	80,54

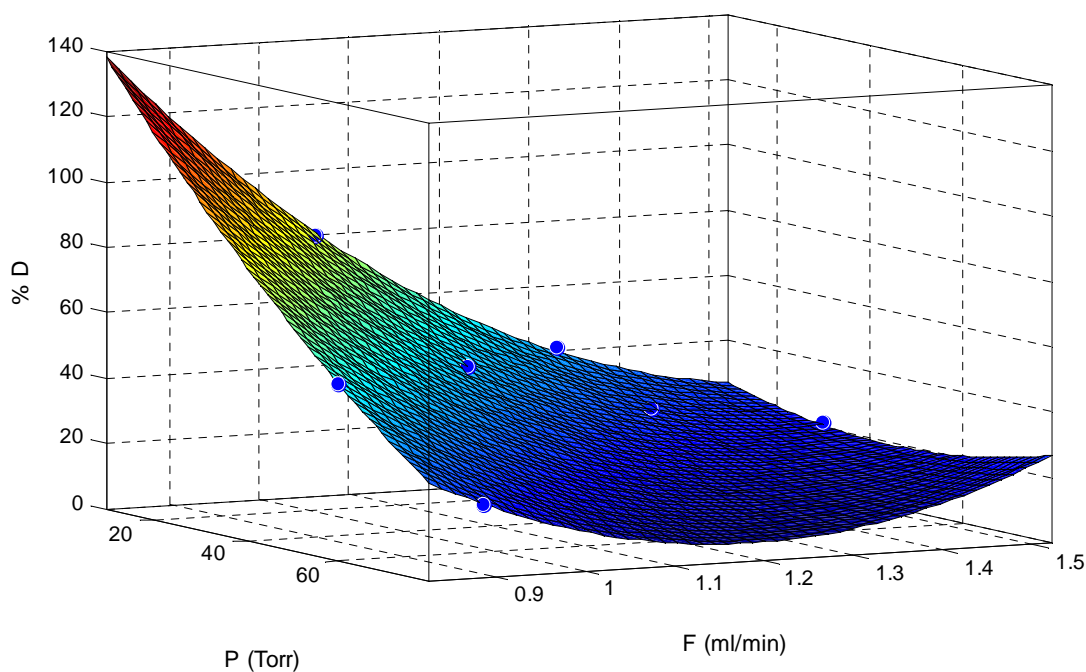


Figura 3.27: Gráfico de representación de la superficie de ajuste del porcentaje de destilado en función de la presión de operación y del flujo de alimentación y datos experimentales.

Se observa que la presión de operación y el flujo de alimentación tuvieron influencia en la cantidad de destilado obtenido. A medida que disminuye la presión de operación y el flujo de alimentación, se obtuvo mayor cantidad de destilado. Al disminuir la presión, la temperatura de evaporación de los compuestos también disminuyó, por lo que los mismos se evaporaron con mayor facilidad. Entonces, a una temperatura de evaporación constante disminuyendo la presión de operación se obtuvo mayor porcentaje de destilado. Por otro lado, al reducirse el flujo de alimentación, la película de aceite esencial de romero que desciende sobre la pared del evaporador es más delgada, produciendo una mayor superficie de contacto, un mayor tiempo de residencia y por lo tanto una mayor cantidad de aceite evaporado. Con una disminución de estos dos factores el incremento del porcentaje de destilado fue más marcado.

Ensayos de destilación molecular en 3 etapas en serie

En esta etapa se trabajó bajo la metodología de destilación en serie, debido a que el objetivo fue obtener un fraccionamiento diferencial de la muestra a destilar, en búsqueda de diferencias en las capacidades antioxidantes de las distintas fracciones. En la primera etapa se alimentó AER, mientras que la alimentación de las etapas siguientes consistió en el residuo de la etapa anterior. Se realizaron 3 etapas, logrando 3 corrientes de destilado y una corriente de residuo. El esquema de esta configuración de operación se representa en la Figura 3.28. La destilación se realizó a temperatura de 12 °C y la temperatura del condensador se fijó en 2 °C. Las diferentes fracciones de destilado y residuo obtenidas se analizaron por cromatografía gaseosa y se les determinó el potencial antioxidante.

En la Tabla 3.5 se muestran las condiciones operativas en las que se llevó a cabo cada etapa, los porcentajes de destilado y de residuo obtenidos en función de la cantidad alimentada en cada etapa % D/F y % R/F, respectivamente. Además se muestran los porcentajes de destilado y residuo en función de la cantidad de aceite esencial alimentado en la primera etapa de la experiencia % D/AER y % R/AER, respectivamente.

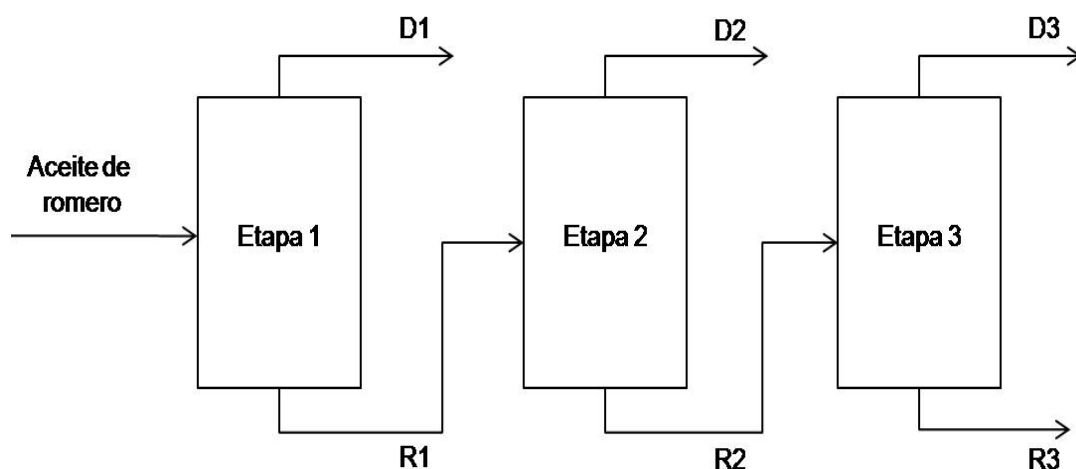


Figura 3.28: Esquema de la operación de destilación molecular en serie en 3 etapas

Los valores de EC_{50} del AER y de las muestras obtenidas como productos de la destilación molecular, destilados y residuos, se muestran en la Tabla 3.6 junto con los compuestos identificados en cada una de estas muestras.

Se observa que la operación de destilación molecular es viable para obtener extractos enriquecidos en capacidad de captación de radicales libres. Los resultados mostraron que el aceite esencial de romero tiene una considerable capacidad antioxidante y que esta se puede potenciar en los compuestos residuales.

Los valores de EC_{50} en las muestras evaluadas sigue el siguiente orden creciente: $R3 < R2 < R1 < D1 < D3 < D2$. Lo que indica que R3 es la fracción que tiene mayor capacidad de captación de radicales libres mientras que D2 es la que tiene menor capacidad de captación de radicales libres. El valor de EC_{50} correspondiente al aceite esencial de romero fue 4,1, valor intermedio entre los valores de EC_{50} de los residuos y los destilados.

Se encontró que el método para medir la actividad antioxidante mediante la capacidad de captación de radicales libres puede ser empleado para determinar el poder antioxidante del AER. Los resultados mostraron que el aceite esencial de romero tiene una considerable capacidad antioxidante.

Tabla 3.5: Resultados de ensayos de destilación molecular (Veloc. rotor: 200 rpm, Tevap.: 12°C, Tcond.:2°C)

Nº Etapa	Alimentación (F)	Flujo (ml/min)	Presión (mbar)	% D/F p/p	% R/F p/p	% D/AER p/p	% R/AER p/p
1	Aceite de romero (AER)	1,11	58,5	7,60	92,40	7,60	92,40
2	R1	1,11	58,5	6,81	93,19	6,29	86,18
3	R2	1,45	48,5	5,30	94,70	4,56	81,55

Tabla 3.6.: Composiciones y valores de EC₅₀ del aceite esencial de romero y de las muestras obtenidas de la destilación molecular

	Aceite de romero	D1	R1	D2	R2	D3	R3
EC₅₀ (mg/ml)	4,1	11,3	4,2	33,2	3,5	23,2	2,5
Componentes	Concentración % p/p						
α-pineno	14,33	25,98 +	11,81	23,48 +	10,96	22,92 +	9,80
β-pineno	1,44	2,29 +	1,24	2,24 +	1,16	2,18 +	1,07
mirceno	6,43	8,87 +	5,62	9,40 +	5,34	9,28 +	5,05
limoneno	2,89	3,65 +	2,68	4,01 +	2,58	4,01 +	2,51
1.8-cineol	25,26	29,29 +	23,99	32,50 +	23,36	32,52 +	22,56
cimeno	3,83	4,43 +	3,60	5,00 +	3,50	5,05 +	3,39
alcanfor	18,22	8,30	19,90 +	11,23	20,53 +	12,15	21,36 +
linalol	2,43	0,00	2,78 +	0,75	2,93 +	0,84	3,10 +
β-cariofileno	2,54	0,00	3,21 +	0,00	3,44 +	0,29	3,59 +
α-terpineol	2,44	0,00	2,89 +	0,65	3,05 +	0,73	3,26 +

+Indica un incremento en la concentración de este componente en la fracción analizada en comparación con la alimentación inicial.

3.4 Conclusiones

Se ha desarrollado un equipamiento prototipo de destilación molecular construido en talleres nacionales, con la capacidad de separar compuestos de similares presiones de vapor, y de alta termolabilidad. Se llevó a cabo la puesta a punto del prototipo para la aplicación específica bajo estudio en esta tesis mediante la realización de diferentes pruebas posteriores al montaje, y se realizaron acciones correctivas que se reflejaron en una operación más sencilla y eficiente del equipo.

Se puede concluir a partir de estos ensayos preliminares que la presión de operación y el flujo de alimentación influyen sobre la cantidad de destilado producido en la operación de destilación molecular. Además, estas condiciones de operación y el porcentaje de destilado obtenido influyen en las composiciones de las fracciones que se obtienen.

La operación de destilación molecular es una operación efectiva para separar y concentrar el AER. Se obtuvieron fracciones con mayor capacidad de captación de radicales libres que el aceite esencial de romero. Al trabajar en varias etapas en serie, estas fracciones enriquecidas en antioxidantes fueron los residuos.

CAPÍTULO 4

Obtención de fracciones concentradas por destilación molecular

En este capítulo se presentan los resultados de la utilización de la operación de destilación molecular para obtener fracciones de aceite esencial de romero con mayor capacidad antioxidante que el aceite mismo. Se realiza una optimización de la operación de destilación molecular con el fin de obtener una mayor concentración de compuestos antioxidantes en las fracciones. Se determina la composición de estas fracciones y, en base a sus propiedades antioxidantes, se las relaciona con los grupos de componentes activos.

4.1 Introducción

En el mercado mundial hay una exigencia cada vez mayor por el consumo de productos naturales. No ajeno a esta tendencia está el interés por los antioxidantes naturales en reemplazo de los antioxidantes sintéticos.

El AER es considerado un antioxidante natural. Sin embargo, es muy difícil atribuir el efecto antioxidante de un aceite esencial en general ya que siempre contiene

una mezcla de diferentes compuestos químicos. Contiene compuestos principales y compuestos minoritarios, y ambos pueden hacer una contribución significativa a la actividad del aceite esencial. Por estas complicaciones es que no ha sido determinado con claridad a cuál o cuáles de los compuestos que estén presentes en el AER se les puede atribuir el potencial antioxidante.

Wang y colab. (2008) compararon la actividad antioxidante del AER con la actividad antioxidante de tres de sus principales componentes: 1,8-cineol, α -pineno y β -pineno. La actividad antioxidante fue determinada mediante la actividad secuestrante del radical libre DPPH[•] y por el método de blanqueo del β -caroteno. A partir de las investigaciones realizadas infieren que la actividad antioxidante en el AER es resultado de una cooperación entre sus constituyentes.

Las investigaciones referidas a la actividad antioxidante del AER son algunas veces contradictorias y esta debilidad en las investigaciones debe superarse comparando el potencial antioxidante de diferentes sustratos por métodos variados (Beretta y colab., 2011).

Se han llevado a cabo varios trabajos de investigación, en los que se comprobó la eficacia de la operación de destilación molecular para el tratamiento de materiales termolábiles de baja volatilidad. Sin embargo, no hay muchos estudios realizados en la aplicación de la destilación molecular para el fraccionamiento de aceites esenciales.

4.2 Objetivo

El objetivo planteado para esta etapa de la tesis fue obtener fracciones mediante destilación molecular, enriquecidas en capacidad antioxidante y relacionar la composición de las mismas con dicha capacidad. Para ello se analizó cromatográficamente la composición de las fracciones con el fin de determinar la distribución de los componentes y se evaluó el potencial antioxidante del AER y de las fracciones obtenidas determinando la actividad secuestrante de radicales libres mediante el radical libre DPPH[•].

4.3 Materiales y métodos

4.3.1 Materia prima

El AER utilizado fue donado por la empresa PLATARIO S.A. El mismo corresponde a la especie *R. officinalis*, cosecha agosto 2011, la cual fue producida en Barreal, Calingasta, provincia de San Juan, 31° 40' latitud Sur, 69° 29' latitud Oeste, a 1650 m sobre el nivel del mar.

4.3.2 Metodología de operación de destilación molecular

La operación de destilación molecular se realizó en el equipo prototipo de película descendente descrito en el capítulo 3 de esta tesis.

Se realizaron experiencias de destilación molecular bajo la metodología de destilación en serie en 4 etapas de destilación. En la primera etapa se alimentó AER y se obtuvieron dos fracciones, destilado y residuo; en las etapas siguientes la alimentación consistió en el residuo obtenido en la etapa anterior. Esta metodología de operación se representa esquemáticamente en la Figura 4.1.

La temperatura del condensador se mantuvo constante a $-2,1$ °C, el baño refrigerante consistió en una mezcla agua-etanol, la temperatura de alimentación se mantuvo constante a 25 °C, la temperatura de evaporación fue de 26 ± 1 °C, el flujo de alimentación se mantuvo en $1,10 \pm 0,05$ ml/min y la velocidad del rotor fue de 200 rpm. La presión de operación a la cual se realizó cada etapa se disminuyó un 50 % respecto a la etapa anterior.

4.3.3 Composición de extractos concentrados

Las composiciones de las fracciones de AER obtenidas a partir de la operación de destilación molecular fueron determinadas cromatográficamente mediante un equipo de cromatografía gaseosa Hewlett Packard HP 6890 con detector de ionización de llama

(FID) y columna INNOWax. El programa de temperatura del horno fue: 2 °C/min desde 60 °C hasta 250 °C, permaneciendo 10 minutos a 250 °C. El flujo del gas carrier (N₂) fue de 0,7 ml/min. La temperatura del inyector fue de 250 °C y la temperatura del detector 350 °C. La muestra se disolvió en hexano y el volumen inyectado fue 1µl. La identificación de los componentes presentes en las muestras se realizó por comparación de los tiempos de retención de los picos de la muestra con el tiempo de retención de los patrones. Las concentraciones relativas fueron calculadas de acuerdo al área de picos dada por el integrador HP3398A.

4.3.4 Actividad secuestrante de radicales libres mediante el radical DPPH[•]

Para evaluar la actividad antioxidante del AER y las fracciones obtenidas en la destilación molecular, se utilizó el método basado en la actividad secuestrante de radicales libres. El radical DPPH[•] fue usado para determinar la capacidad de captación de radicales libres, ya que en presencia de un antioxidante se reduce a DPPH-H disminuyendo su absorbancia espectrofotométrica. La técnica utilizada fue la misma que se detalló en el capítulo 3 de la presente tesis.

4.3.5 Análisis estadístico de resultados

Los ensayos fueron realizados por triplicado, se determinaron medias y desvíos estándares mediante el Software InfoStat, versión 2012.p (Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina). Se determinaron diferencias significativas entre muestras mediante ANOVA y test posterior LSD ($\alpha= 0,05$). Se analizaron relaciones entre variables (EC₅₀ y composición química) y tratamientos (diferentes destilados y residuos obtenidos del proceso de destilación molecular) mediante análisis multivariado de componentes principales.

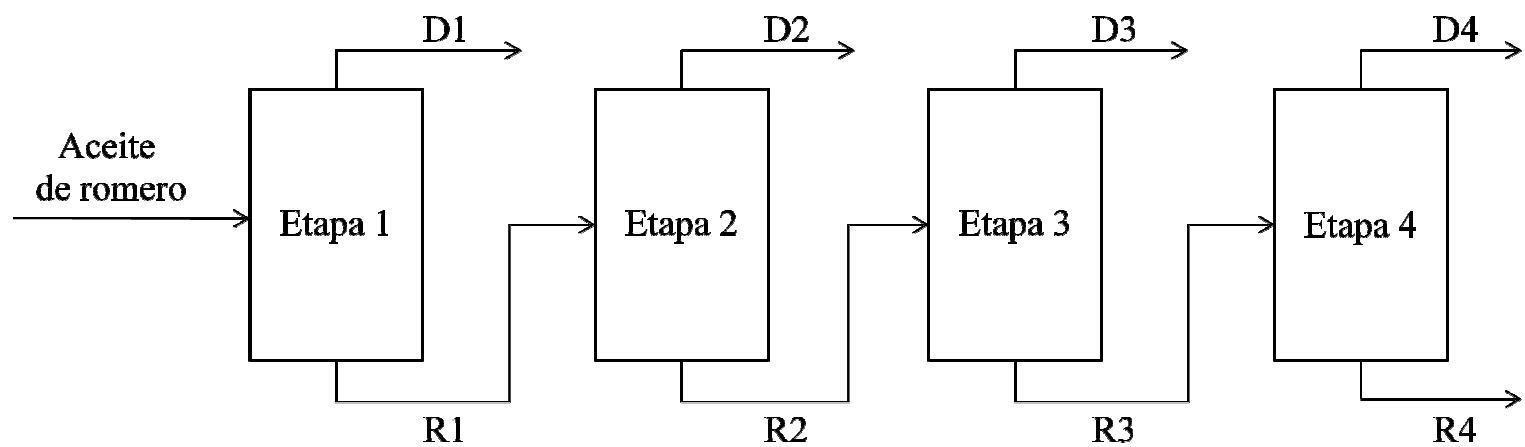


Figura 4.1: Esquema representativo de la metodología de destilación molecular en serie de 4 etapas

4.4 Resultados y discusión

4.4.1 Resultados de los ensayos de destilación molecular

Las condiciones operativas a las cuales se realizaron los ensayos de la destilación molecular y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.1. En la misma se muestran los porcentajes de destilado y de residuo obtenidos en función de la cantidad alimentada en cada etapa, % D/F y % R/F, respectivamente. Además se muestran los porcentajes de destilado y residuo en función de la cantidad de aceite esencial alimentado en la primera etapa de la experiencia, % D/AER y % R/AER, respectivamente.

4.4.2 Resultados de la composición de extractos concentrados

En la Tabla 4.2 se muestran las concentraciones de las fracciones obtenidas por destilación molecular y del AER alimentado en la primera etapa.

Los componentes se dividieron incluyéndose en los grupos a los que pertenecen, siendo estos: monoterpenos hidrocarbonados (terpenos de 10 carbonos), monoterpenos oxigenados (terpenos de 10 carbonos en los que hay presente un átomo de oxígeno), sesquiterpenos hidrocarbonados (terpenos de 15 carbonos), sesquiterpenos oxigenados (terpenos de 15 carbonos en los que hay presente un átomo de oxígeno) y diterpenos hidrocarbonados (terpenos de 20 carbonos).

Como puede observarse en la Tabla 4.2, las fracciones enriquecidas en monoterpenos hidrocarbonados son D1 y D2, mientras que R4 es el que presenta la mínima cantidad de estos componentes. Todos los residuos y los destilados D3 y D4 están enriquecidos en monoterpenos oxigenados. Por otro lado las fracciones que tienen mayor cantidad de sesquiterpenos hidrocarbonados que el AER son D4 y todos los residuos. Todos los residuos presentan, además, enriquecimiento en los sesquiterpenos oxigenados y en los diterpenos hidrocarbonados.

En la Figura 4.2 se muestran los cromatogramas del AER y de las fracciones D1 y R4 que permiten comparar la distribución de los principales componentes.

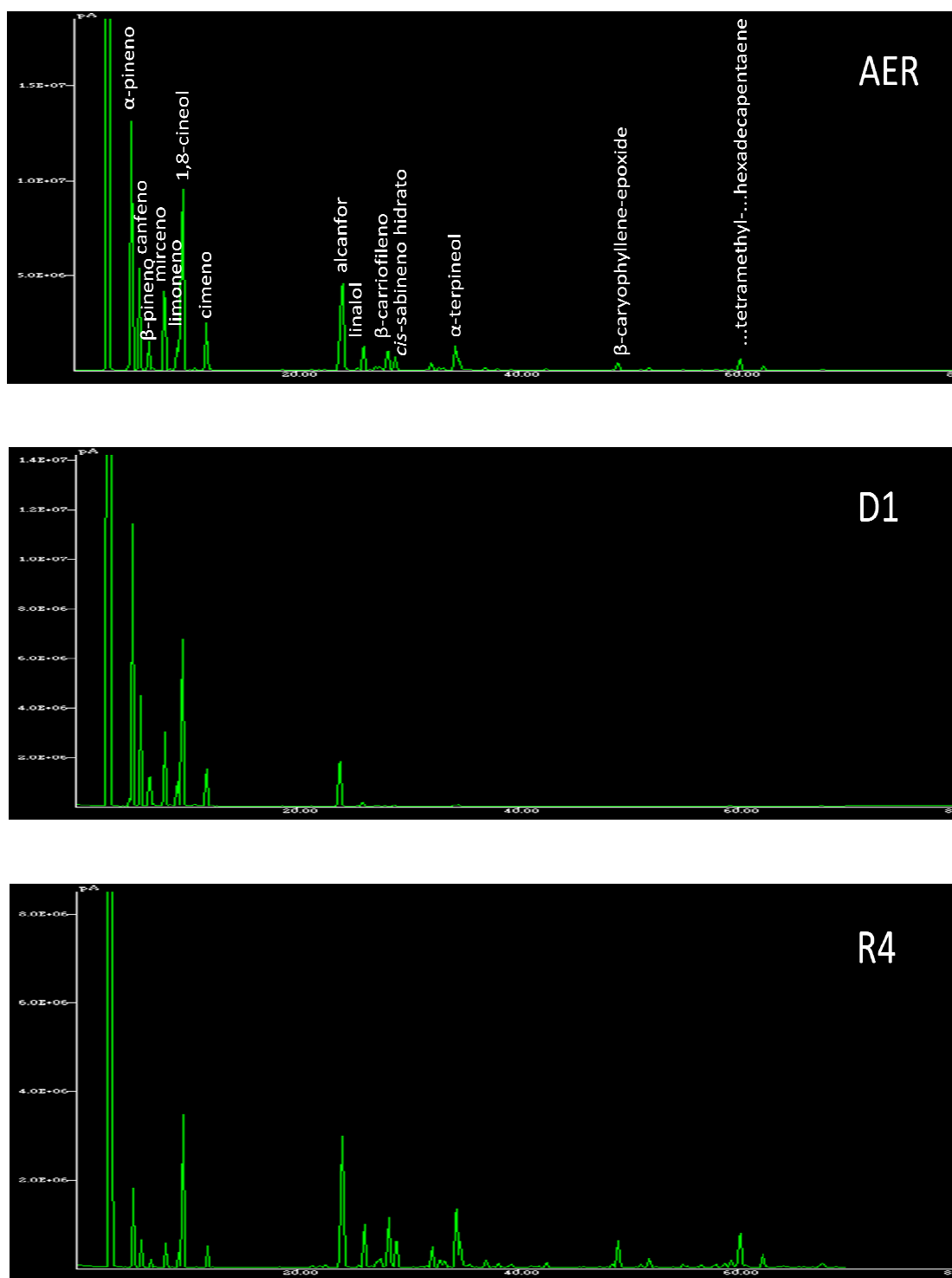


Figura 4.2: Comparación de cromatogramas de AER y algunas de las fracciones obtenidas.

Tabla 4.1: Condiciones operativas y porcentajes de destilados y residuos obtenidos por destilación molecular del aceite esencial de romero.

Nº etapa	Alimentación (F)	Presión (Torr)	% D/F p/p	%R/F p/p	% D/AER p/p	%R/AER p/p
1	Aceite de romero (AER)	45,00	19,67 ± 0,30	80,33 ± 0,30	19,67 ± 0,30	80,33 ± 0,30
2	R1	22,50	20,24 ± 1,06	79,76 ± 1,06	16,27 ± 0,91	64,07 ± 0,62
3	R2	11,25	16,26 ± 0,42	83,74 ± 0,42	10,42 ± 0,37	53,65 ± 0,24
4	R3	5,75	14,89 ± 3,31	85,12 ± 3,32	7,99 ± 1,81	45,66 ± 1,57
Σ D/AER					54,35	

Capítulo 4: Obtención de fracciones concentradas por destilación molecular

Tabla 4.2: Composición química de las diferentes fracciones de aceite esencial de romero y las diferentes fracciones obtenidas por destilación molecular

Compuestos	Concentración (% p/p)								
	AER	D1	D2	D3	D4	R1	R2	R3	R4
Monoterpenos Hidrocarbonados	35,23	57,01*	40,47*	29,09	16,11	27,68	18,96	9,47	7,37
α -pineno	15,77 \pm 0,66 ^e	28,68 \pm 0,28 ^f	18,55 \pm 1,18 ^e	9,96 \pm 1,48 ^{cd}	5,04 \pm 0,45 ^{ab}	10,85 \pm 2,65 ^d	6,46 \pm 1,00 ^{bc}	3,17 \pm 0,32 ^a	2,60 \pm 0,03 ^a
canfeno	5,31 \pm 0,25 ^e	9,30 \pm 0,09 ^g	6,50 \pm 0,35 ^f	3,70 \pm 0,50 ^{cd}	1,96 \pm 0,16 ^{ab}	3,87 \pm 0,85 ^d	2,46 \pm 0,41 ^{bc}	1,24 \pm 0,12 ^a	1,03 \pm 0,01 ^a
β -pineno	1,53 \pm 0,08 ^d	2,52 \pm 0,00 ^f	1,99 \pm 0,07 ^e	1,22 \pm 0,14 ^{cd}	0,67 \pm 0,04 ^{ab}	1,21 \pm 0,23 ^c	0,84 \pm 0,17 ^{bc}	0,41 \pm 0,04 ^a	0,34 \pm 0,01 ^a
mircenol	5,65 \pm 0,18 ^c	8,05 \pm 0,01 ^d	7,74 \pm 0,03 ^d	5,68 \pm 0,39 ^c	2,92 \pm 0,05 ^b	4,91 \pm 0,83 ^c	3,44 \pm 0,50 ^b	1,54 \pm 0,10 ^a	1,10 \pm 0,07 ^a
limoneno	2,90 \pm 0,04 ^c	3,65 \pm 0,05 ^d	4,01 \pm 0,02 ^d	3,34 \pm 0,21 ^{cd}	2,07 \pm 0,05 ^b	2,76 \pm 0,35 ^c	2,26 \pm 0,31 ^b	1,20 \pm 0,09 ^a	0,92 \pm 0,04 ^a
cimeno	4,07 \pm 0,13 ^{bc}	4,81 \pm 0,03 ^{cd}	5,69 \pm 0,02 ^d	5,19 \pm 0,35 ^d	3,45 \pm 0,09 ^b	4,08 \pm 0,52 ^{bc}	3,50 \pm 0,35 ^b	1,91 \pm 0,17 ^a	1,38 \pm 0,04 ^a
Monoterpenos Oxigenados	56,53	42,74	55,00	68,41*	77,20*	61,01*	67,85*	63,65*	61,28*
1,8-cineol	29,24 \pm 0,31 ^c	32,97 \pm 0,18 ^d	37,29 \pm 0,52 ^d	34,24 \pm 1,30 ^d	22,77 \pm 0,46 ^b	27,07 \pm 2,35 ^c	22,39 \pm 1,64 ^b	13,75 \pm 1,09 ^a	11,33 \pm 0,16 ^a
alcanfor	20,33 \pm 0,24 ^c	8,81 \pm 0,14 ^a	15,71 \pm 0,60 ^b	27,99 \pm 1,97 ^{de}	40,35 \pm 0,44 ^g	24,88 \pm 0,47 ^d	31,91 \pm 1,01 ^f	31,88 \pm 2,28 ^f	29,56 \pm 1,09 ^{ef}
linalol	2,56 \pm 0,10 ^b	0,50 \pm 0,00 ^a	1,02 \pm 0,16 ^a	3,17 \pm 0,70 ^c	6,34 \pm 0,05 ^f	3,32 \pm 0,31 ^c	4,58 \pm 0,11 ^d	5,52 \pm 0,31 ^e	5,40 \pm 0,20 ^e
<i>cis</i> - sabineno hidrato	1,35 \pm 0,09 ^b	0,20 \pm 0,00 ^a	0,42 \pm 0,05 ^a	1,21 \pm 0,26 ^b	2,76 \pm 0,02 ^c	1,70 \pm 0,29 ^b	2,46 \pm 0,03 ^c	3,28 \pm 0,16 ^d	3,52 \pm 0,21 ^d
α -terpineol	3,05 \pm 0,15 ^{bc}	0,26 \pm 0,01 ^a	0,56 \pm 0,05 ^a	1,80 \pm 0,40 ^{ab}	4,98 \pm 0,11 ^{de}	4,04 \pm 0,50 ^{cd}	6,51 \pm 0,07 ^e	9,22 \pm 0,5 ^f	11,47 \pm 1,21 ^g

Diferentes letras indican diferencia significativa en la comparación de medias, ANOVA y Test LSD Fisher ($\alpha = 0,05$).

* fracciones enriquecidas con respecto al AER en estos componentes

Tabla 4.2 (Continuación): Composición química de las diferentes fracciones de aceite esencial de romero y las diferentes fracciones obtenidas por destilación molecular

Compuestos	Concentración (% p/p)								
	AER	D1	D2	D3	D4	R1	R2	R3	R4
Sesquiterpenos hidrocarbonados	2,60	0,11	0,24	0,90	2,71*	3,46*	5,03*	8,68*	10,82*
β-cariofileno	2,60 ± 0,02 ^{bc}	0,11 ± 0,00 ^a	0,24 ± 0,06 ^a	0,90 ± 0,31 ^{ab}	2,71 ± 0,02 ^{bc}	3,46 ± 1,11 ^{cd}	5,03 ± 0,95 ^d	8,68 ± 0,44 ^e	10,82 ± 0,41 ^f
Sesquiterpenos Oxigenados	0,95	0,00	0,00	0,00	0,00	1,17*	1,24*	2,95*	3,68*
β-cariofileno epoxi	0,95 ± 0,18 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	1,17 ± 0,82 ^a	1,24 ± 0,45 ^a	2,95 ± 0,92 ^b	3,68 ± 0,57 ^b
Diterpenos hidrocarbonados	1,72	0,00	0,00	0,00	0,00	2,27*	2,38*	6,08*	7,00*
(6E,8E,10E)- 2,6,11,15- Tetrametil- 2,6,8,10,14- hexadecapentaeno	1,72 ± 0,33 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	2,27 ± 1,58 ^a	2,38 ± 1,23 ^a	6,08 ± 1,85 ^b	7,00 ± 1,34 ^b

Diferentes letras indican diferencia significativa en la comparación de medias, ANOVA y Test LSD Fisher ($\alpha = 0,05$).

* fracciones enriquecidas con respecto al AER en estos componentes.

4.4.3 Análisis de las concentraciones de extractos concentrados

Los índices de concentración (IC) y los rendimientos porcentuales (η) referidos a la alimentación inicial de aceite de romero, se muestran en la Tabla 4.3. Se resaltaron los valores de rendimientos porcentuales superiores al 50 %, lo que indica que los componentes se encuentran en mayor parte en esta fracción resaltada. También se resaltaron los índices de concentración positivos, que indican que en esta fracción los componentes se encuentran concentrados respecto a la alimentación.

Se graficaron las concentraciones, rendimientos porcentuales e índices de concentración de los componentes en todas las etapas a modo de evidenciar con mayor claridad las tendencias encontradas. Las gráficas se dividieron en destilados y residuos, y a su vez en componentes más y menos volátiles a modo de facilitar su interpretación. Estas gráficas se presentan en el Anexo I.

Al analizar los índices de concentración, presentados en la Tabla 4.3 se observa que los componentes más volátiles, α -pineno, canfeno, β -pineno, mirceno, limoneno, 1,8-cineol y cimeno se concentraron en las fracciones de destilado de las primeras etapas. En el alcanfor se observa un punto de quiebre, ya que este compuesto y los de menor volatilidad se concentraron en los destilados de las últimas etapas y en los residuos.

Los compuestos menos volátiles presentaron un gran incremento en los índices de concentración en los residuos, llegando a valores de 300 y 400 % respecto al aceite de romero alimentado en la primera etapa; los rendimientos porcentuales fueron mayores en los residuos, intensificados en las últimas etapas. Esto se debe a que este valor depende de la masa obtenida en cada fracción y, en todas las etapas, se obtuvo mayor cantidad de residuo que de destilado, y esto se acumuló progresivamente hasta la última etapa.

Al analizar las concentraciones de los componentes en los residuos se observa que los componentes más volátiles disminuyeron su concentración con el avance de las etapas, esto se debe a que se evaporaron en las primeras etapas, por lo que en los residuos quedó menos cantidad de estos componentes.

Tabla 4.3: Relaciones entre los compuestos de las fracciones y del aceite esencial de romero

Compuesto	xAER		D1	D2	D3	D4		R1	R2	R3	R4
α-pineno	15,77	x	28,68	18,55	9,96	5,04	x	10,85	6,46	3,17	2,60
		η	35,39	19,89	6,42	2,14	η	55,41	26,07	10,75	7,71
		IC	81,86	17,63	-36,84	-68,04	IC	-31,20	-59,04	-79,90	-83,51
canfeno	5,31	x	9,30	6,50	3,70	1,96	x	3,87	2,46	1,24	1,03
		η	34,08	20,70	7,08	2,48	η	58,70	29,48	12,49	9,07
		IC	75,14	22,41	-30,32	-63,09	IC	-27,12	-53,67	-76,65	-80,60
β-pineno	1,53	x	2,52	1,99	1,22	0,67	x	1,21	0,84	0,41	0,34
		η	32,05	21,99	8,10	2,94	η	63,70	34,93	14,33	10,39
		IC	64,71	30,07	-20,26	-56,21	IC	-20,92	-45,10	-73,20	-77,78
mirceno	5,65	x	8,05	7,74	5,68	2,92	x	4,91	3,44	1,54	1,10
		η	27,73	23,17	10,21	3,47	η	69,99	38,74	14,58	9,11
		IC	42,48	36,99	0,53	-48,32	IC	-13,10	-39,12	-72,74	-80,53
limoneno	2,90	x	3,65	4,01	3,34	2,07	x	2,76	2,26	1,20	0,92
		η	24,49	23,38	11,70	4,79	η	76,65	49,59	22,13	14,84
		IC	25,86	38,28	15,17	-28,62	IC	-4,83	-22,07	-58,62	-68,28

Tabla 4.3 (Continuación): Relaciones entre los compuestos de las fracciones y del aceite esencial de romero

Compuesto	xAER		D1	D2	D3	D4		R1	R2	R3	R4
1,8-cineol	29,24	x	32,97	37,29	34,24	22,77	x	27,07	22,39	13,75	11,33
		η	21,94	21,57	11,90	5,23	η	74,56	48,72	25,15	18,12
		IC	12,76	27,53	17,10	-22,13	IC	-7,42	-23,43	-52,98	-61,25
cimeno	4,07	x	4,81	5,69	5,19	3,45	x	4,08	3,50	1,91	1,38
		η	23,00	23,64	12,96	5,69	η	80,74	54,72	25,10	15,86
		IC	18,18	39,80	27,52	-15,23	IC	0,25	-14,00	-53,07	-66,09
alcanfor	20,33	x	8,81	15,71	27,99	40,35	x	24,88	31,91	31,88	29,56
		η	8,43	13,07	13,99	13,32	η	98,57	99,87	83,86	68,00
		IC	-56,67	-22,73	37,68	98,48	IC	22,38	56,96	56,81	45,40
linalol	2,56	x	0,50	1,02	3,17	6,34	x	3,32	4,58	5,52	5,40
		η	3,80	6,74	12,58	16,62	η	104,45	113,84	115,32	98,66
		IC	-80,47	-60,16	23,83	147,66	IC	29,69	78,91	115,63	110,94
β-cariofileno	2,60	x	0,11	0,24	0,90	2,71	x	3,46	5,03	8,68	10,82
		η	0,82	1,56	3,52	6,99	η	107,18	123,10	178,54	194,64
		IC	-95,77	-90,77	-65,38	4,23	IC	33,08	93,46	233,85	316,15

Tabla 4.3 (Continuación): Relaciones entre los compuestos de las fracciones y del aceite esencial de romero

Compuesto	xAER		D1	D2	D3	D4		R1	R2	R3	R4
<i>cis</i> - sabineno hidrato	1,35	x	0,20	0,42	1,21	2,76	x	1,70	2,46	3,28	3,52
		η	2,88	5,26	9,11	13,72	η	101,42	115,95	129,94	121,95
		IC	-85,19	-68,89	-10,37	104,44	IC	25,93	82,22	142,96	160,74
α-terpineol	3,05	x	0,26	0,56	1,80	4,98	x	4,04	6,51	9,22	11,47
		η	1,66	3,10	6,00	10,96	η	106,68	135,81	161,67	175,89
		IC	-91,48	-81,64	-40,98	63,28	IC	32,46	113,44	202,30	276,07
β-cariofileno epoxi	0,95	x	0,00	0,00	0,00	0,00	x	1,17	1,24	2,95	3,68
		η	0,00	0,00	0,00	0,00	η	99,19	83,05	166,07	181,17
		IC	-100,00	-100,00	-100,00	-100,00	IC	23,16	30,53	210,53	287,37
(6E,8E,10E)- 2,6,11,15- Tetrametil- 2,6,8,10,14- hexadecapentaeno	1,72	x	0,00	0,00	0,00	0,00	x	2,27	2,38	6,08	7,00
		η	0,00	0,00	0,00	0,00	η	106,29	88,05	189,05	190,34
		IC	-100,00	-100,00	-100,00	-100,00	IC	31,98	38,37	253,49	306,98

Al analizar los rendimientos de los componentes en los residuos se observa una disminución en los componentes más volátiles con el avance de las etapas. El alcanfor mostró un comportamiento distinto ya que en los residuos 2 y 3 evidenció una mayor concentración que en los residuos 1 y 4 y su rendimiento presentó un máximo en el residuo 2 a partir del cual disminuyó. La composición de los componentes menos volátiles, en todos los casos, presentó un máximo en el residuo 4. Se observa que los rendimientos de los componentes menos volátiles en los residuos fueron valores muy grandes indicando que se encuentran en mucho mayor cantidad en estas fracciones que en el aceite esencial de romero del que se partió.

Los índices de concentración evidencian que los componentes que presentaron un mayor aumento de concentración en los residuos fueron los componentes menos volátiles y a su vez en las últimas etapas, alcanzando índices de concentración superiores al 250 %. Los componentes más volátiles presentaron índices de concentración negativos, ya que en todos los casos la concentración de los mismos en los residuos fue inferior a la concentración que presentaron en el aceite esencial de romero. El alcanfor presentó un comportamiento similar a los componentes menos volátiles.

Los compuestos más volátiles disminuyeron su concentración a medida que se avanzó en el número de etapas de los destilados; esto se debe a que los componentes más volátiles fueron evaporados en mayor parte en la primera etapa. Al analizar los rendimientos de los mismos se evidencia este comportamiento, en la primera etapa el rendimiento fue mayor. Los componentes 1-8 cineol y cimeno presentaron un comportamiento distinto; su composición presentó un máximo en la segunda etapa, y el rendimiento también fue máximo en estos dos puntos. El alcanfor presentó un aumento gradual de su composición a lo largo de las etapas, presentando un máximo en la última de ellas; analizando este comportamiento, se ve que se asemejó al comportamiento de los componentes menos volátiles, donde todos presentaron el máximo de concentración en la última etapa. Esto se debe a que los componentes menos volátiles requieren condiciones más severas de vacío para evaporarse, y menos resistencias presentes, y éstas se dieron en la última etapa. El rendimiento de los componentes menos volátiles en los destilados también presentó un máximo en la última etapa. El alcanfor, a

diferencia del resto de los componentes presentó un máximo de rendimiento en los destilados en la tercera etapa. Los índices de concentración, de los componentes más volátiles, α -pineno, canfeno, β -pineno y mirceno, presentaron su mayor índice de concentración en la primera etapa; limoneno, 1,8-cineol y cimeno, tuvieron un máximo de índice de concentración en la etapa 2 y los componentes menos volátiles presentaron su máximo de índice de concentración en la última etapa. En muchos casos se presentaron índices de concentración negativos, indicando que esos componentes se encuentran menos concentrados en esa etapa que en el aceite esencial de romero alimentado a la primera etapa.

4.4.4 Actividad secuestrante de radicales libres mediante el radical DPPH[•]

Los valores de EC_{50} de las muestras evaluadas: AER y destilados y residuos obtenidos en cada etapa de la destilación molecular, se muestran en la Tabla 4.4.

Del análisis de varianza se encontró que el efecto tratamiento sobre la variable analizada (EC_{50}) fue estadísticamente significativo con un p-valor de 0,0001. Es decir, las diferentes muestras analizadas (AER, destilados y residuos) se diferenciaron significativamente en sus valores de EC_{50} . Los resultados de la comparación de medias (test posterior LSD Fisher, $\alpha=0,05$) se muestran en la Tabla 4.4.

Las muestras de destilado D1 y D2 presentaron valores de EC_{50} muy altos y lejanos con respecto al resto de las muestras analizadas, indicando que estas muestras presentaron menor actividad antioxidante.

Los residuos presentaron los menores valores de EC_{50} indicando que los mismos tienen un poder antioxidante mayor que el resto de las muestras analizadas. El residuo que presentó mejores valores de EC_{50} fue el residuo R4, que se diferenció estadísticamente de los demás. Entre R3 y R2 no se observaron diferencias significativas en los valores de EC_{50} .

Bozin y colab. (2007) reportaron un valor cercano ($EC_{50} = 3,82 \mu\text{l/ml}$) aunque levemente inferior que el encontrado en esta tesis para el AER .

Tabla 4.4: Medias \pm desvíos estándar de EC₅₀ del aceite esencial de romero y de las diferentes fracciones obtenidas por destilación molecular: destilados (D) y residuos (R).

Muestra	EC ₅₀ (μl/ml)	*
AER	4,39 \pm 0,07	D
D1	>100	G
D2	>100	G
D3	29,17 \pm 0,22	F
D4	12,81 \pm 0,11	E
R1	3,20 \pm 0,09	C
R2	2,35 \pm 0,04	B
R3	2,28 \pm 0,08	B
R4	1,82 \pm 0,10	A

*Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas, ANOVA y test LSD Fisher, para $\alpha=0,05$ y DMS= 0,78680.

4.4.5 Análisis de componentes principales

A partir de los resultados obtenidos del análisis de captación de radicales libres se procedió a realizar un análisis multivariado de componentes principales para analizar la relación de este indicador de capacidad antioxidante del AER y las fracciones obtenidas de la DM con los componentes. Para realizar este análisis se clasificaron los valores de EC₅₀ en niveles, según se muestra en la Tabla 4.5.

En la Figura 4.3 se muestra el gráfico biplot resultado del análisis de componentes principales. Los vectores representan los componentes, y los puntos a las fracciones que se obtuvieron por medio de la DM junto con los valores de EC₅₀ representados por niveles. Entre las componentes CP1 y CP2 se explica el 97,5 % de la variabilidad de los datos.

Al analizar la Figura 4.3 puede observarse que los componentes que están agrupados entre sí, por ejemplo, α -pineno, canfeno y β -pineno, están relacionados entre sí. Por otro lado cimeno, 1,8-cineol y limoneno están relacionados; α -terpineol, β -cariofileno, β -cariofileno-epoxi y 6E,8E,10E-2,6,11,15-Tetrametil-2,6,8,10,14-hexadecapentaeno; linalol y alcanfor también están relacionados entre sí.

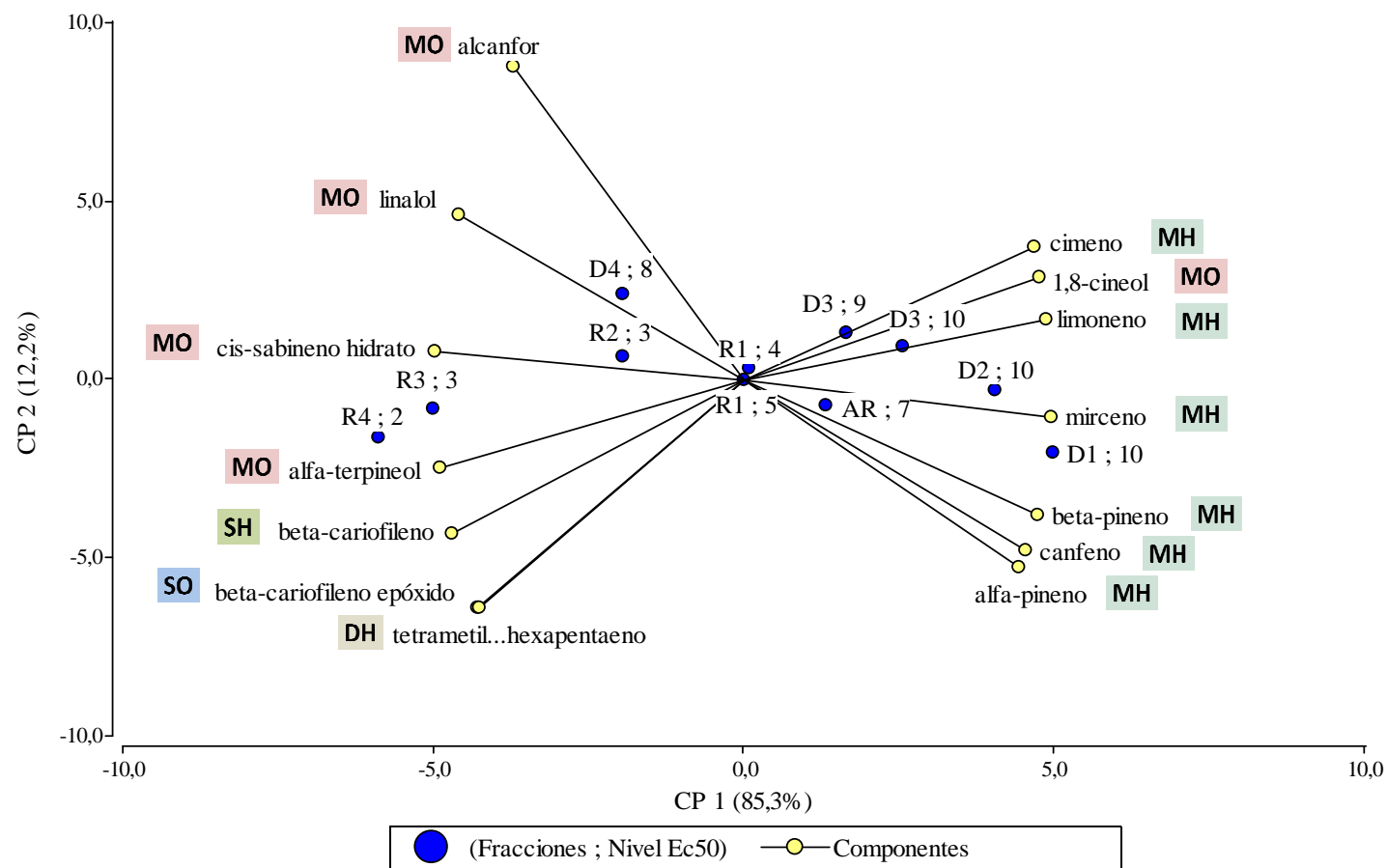


Figura 4.3: Biplot del análisis de componentes principales de las fracciones obtenidas del proceso de destilación molecular del AER: residuos (R1, R2, R3 y R4) y destilados: (D1, D2, D3 y D4) y de los distintos niveles de EC₅₀ para las concentraciones de los diferentes componentes. MH: Monoterpeno hidrocarbonado, MO: Monoterpeno oxigenado, SH: Sesquiterpeno hidrocarbonado, SO: Sesquiterpeno oxigenado, DH Diterpeno hidrocarbonado.

Tabla 4.5: Niveles de valores de EC₅₀ establecidos

Nivel	Rango de valores de EC ₅₀
1	0,00-1,00 µl/ml
2	1,01-2,00 µl/ml
3	2,01-2,50 µl/ml
4	2,51-3,00 µl/ml
5	3,01-3,50 µl/ml
6	3,51-4,00 µl/ml
7	4,01-5,00 µl/ml
8	5,01-20,00 µl/ml
9	20,01-40,00 µl/ml
10	>40,01 µl/ml

Se observa que D1 se encuentra ligado a las más altas concentraciones de α -pineno, canfeno, β -pineno y mirceno y que, a su vez, presenta un mínimo en las concentraciones de *cis*-sabineno hidrato, linalol y alcanfor, que se encuentran ubicados en el extremo opuesto del gráfico; de la misma manera puede analizarse D2 que presenta las máximas concentraciones de limoneno, 1,8-cineol y cimeno y altas concentraciones de mirceno. Por su lado D4 presenta las concentraciones máximas en alcanfor y linalol.

R4 presenta las máximas concentraciones de los componentes menos volátiles siendo la mayor de estas concentraciones la de α -terpineol. R3 está muy ligado a R4, y presenta composiciones muy similares. R1, R2 y AER están ubicados cerca del centro del gráfico, por lo que no presentan composición máxima de ninguno de los componentes.

Se puede observar, además, que los mayores valores de EC₅₀ (que indican menor capacidad antioxidante) están a la derecha de la gráfica y se asocian con valores altos de mirceno, limoneno, 1,8-cineol, cimeno, α -pineno, canfeno y β -pineno y están relacionadas con las muestras D1, D2 y D3. Los componentes alcanfor y linalol también están relacionados con altos valores de EC₅₀ y se asocian con la muestra D4.

Los valores más bajos de EC₅₀, componentes con mayor poder de captación de radicales libres, se asocian principalmente con composiciones elevadas de *cis*-sabineno

hidrato y α -terpineol, asociados con las muestras R3 y R4. Con esto se corrobora que las fracciones de residuos se concentran en componentes con poder antioxidante. Con este análisis se concluye que los componentes que aportan el poder antioxidante al aceite esencial de romero y a las fracciones enriquecidas en poder antioxidante son, principalmente, α -terpineol y *cis*-sabineno hidrato.

4.5 Conclusiones

En esta etapa se demostró que mediante la operación de destilación molecular se pueden obtener fracciones enriquecidas en poder antioxidante (capacidad de captación de radicales libres) a partir del aceite esencial de romero. Los residuos obtenidos en el proceso de destilación molecular presentaron los valores de EC₅₀ más pequeños, demostrando que tienen elevada actividad antioxidante. Según el análisis de componentes principales realizado entre los valores de EC₅₀ y los compuestos presentes en las fracciones se concluye que los compuestos que se asocian a mayor actividad antioxidante en las fracciones analizadas son α -terpineol y *cis*-sabineno hidrato, ambos compuestos son monoterpenos oxigenados.

CAPÍTULO 5

Estabilidad oxidativa de aceite de girasol enriquecido con aceite esencial de romero y fracciones obtenidas por destilación molecular

En este capítulo se presenta un estudio de estabilidad oxidativa evidenciando el efecto preservante que tienen las fracciones del aceite esencial de romero obtenidas por destilación molecular, adicionadas a una matriz lipídica (aceite de girasol).

5.1 Introducción

El girasol (*Helianthus annuus*) es uno de los cuatro principales cultivos anuales de semillas oleaginosas producidas en el mundo.

El aceite de girasol convencional es el aceite más consumido en Argentina, representando el 70% del consumo interno de aceite (ASAGIR, 2014). Dicho aceite, es uno de los aceites vegetales disponibles más saludables ya que presenta alto porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), los cuales pueden ser beneficiosos para la reducción de los niveles de colesterol en el hombre.

El aceite de girasol es una excelente fuente de ácidos grasos esenciales requeridos por el cuerpo humano, siendo el ácido linoleico uno de ellos (Bourre y colab., 1989). Presenta un contenido de vitamina E (α -tocoferol) (45 mg por 100 g) superior al de los principales aceites vegetales (Hui, 1996). Es conocido, sin embargo, que la estabilidad de los lípidos depende del grado de insaturación de sus aceites. El aceite de girasol comestible contiene grandes cantidades de ácidos grasos insaturados, especialmente poliinsaturados, como el ácido linoleico (18:2 ω -6), motivo que lo hace muy susceptible a la oxidación. La oxidación lipídica de aceites produce olores rancios, sabores desagradables y decoloración. Pero su principal inconveniente es que también produce una disminución de la calidad y la seguridad nutricional del aceite debido a los productos de degradación producidos, resultando en efectos nocivos sobre la salud humana (Lercker y Rodríguez-Estrada, 2002).

Para retardar el deterioro oxidativo, se añaden antioxidantes a los aceites comestibles, con el objetivo de mantener la calidad y prolongar la vida útil de los mismos. En el mercado mundial, hay una demanda creciente en el consumo de productos naturales. Por lo tanto, el interés en antioxidantes naturales para reemplazar los antioxidantes sintéticos está aumentando cada día.

Los antioxidantes naturales están ampliamente presentes en la naturaleza. Se los encuentra mayoritariamente en el reino vegetal, formando parte de semillas, frutos, hojas, raíces; de una amplia variedad de plantas, árboles, arbustos, hongos, etc. Las principales fuentes de antioxidantes naturales son: té, cacao, especias, hierbas, aceites, semillas, cereales, granos y frutas. Los antioxidantes naturales presentan las siguientes ventajas: (i) son aceptados por los consumidores; (ii) son considerados seguros; (iii) no requieren pruebas de toxicidad y seguridad por la legislación; (iv) se obtienen de fuentes naturales las cuales han sido utilizadas por la población durante cientos de años para su alimentación; (v) aportan propiedades funcionales y organolépticas a los alimentos en los cuales son aplicados (Sacchetti y colab., 2005).

Existen numerosos estudios acerca de la estabilidad oxidativa de distintos lípidos que han sido adicionados con hierbas secas y aceites esenciales.

Martínez y colab. (2013) evaluaron el efecto del agregado de antioxidantes naturales y sintéticos sobre la estabilidad oxidativa de aceite de nuez almacenado bajo

diferentes condiciones. A las muestras de aceite de nuez se les adicionó extracto de romero, palmitato de ascorbilo y TBHQ. Las muestras fueron analizadas según los métodos de acidez, valor de peróxido, dienos y trienos conjugados y valor de p-anisidina. Para las muestras almacenadas en la oscuridad, observaron una importante reducción en la oxidación lipídica de todas aquellas adicionadas con antioxidantes naturales o sintéticos.

Özcan y colab. (2011) estudiaron el efecto antioxidante de la adición de aceites esenciales de romero, clavo de olor y canela a aceites de avellana y amapola. La actividad antioxidante de los aceites esenciales fue determinada a través de la medición del valor de peróxido a intervalos regulares, concluyendo que las muestras adicionadas con aceites esenciales mostraron un mayor efecto antioxidante que aquellas de control sin antioxidantes agregados. De los aceites esenciales estudiados, el de canela resultó ser el más efectivo en el retardo de la oxidación lipídica de los aceites crudos, seguido por el de clavo de olor y el de romero. Los autores sugieren que la actividad antioxidante observada podría estar relacionada con la presencia de timol, carvacrol y eugenol en los extractos.

Olmedo y colab. (2013) estudiaron el efecto de los aceites esenciales de orégano y romero sobre la estabilidad oxidativa y fermentativa de queso saborizado preparado utilizando como base queso crema. Estudiaron una muestra control consistente en queso crema sin aditivos, una muestra de queso crema con el agregado de aceite esencial de orégano y otra con el agregado de aceite esencial de romero. La estabilidad oxidativa de las muestras fue monitoreada mediante el índice de peróxidos y el valor de p-anisidina. El resultado de la investigación demostró que los aceites esenciales agregados mejoraron la estabilidad oxidativa y fermentativa del queso crema, previniendo su oxidación lipídica y el desarrollo de rancidez. Como consecuencia, estos aceites esenciales, prolongarían la vida útil del producto terminado en el mercado.

Tsimidou y colab. (1995) estudiaron la actividad antioxidante de aceite de caballa con el agregado de hojas secas de orégano. El poder antioxidante se midió en función del índice de peróxido de las muestras estudiadas. La adición de orégano inhibió la oxidación del aceite y se concluyó que su efecto puede ser comparado al de antioxidantes sintéticos como TBHQ y BHA.

Singh y colab. (2008) analizaron la actividad antioxidante y antimicrobiana de oleorresina y aceite esencial de jengibre. La actividad antioxidante fue evaluada sobre aceite de mostaza crudo mediante las técnicas de índice de peróxidos, p-anisidina, TBA (ácido tiobarbitúrico), FTC (tiocianato férrico) y DPPH[•].

Todas estas metodologías de evaluación de poder antioxidante mostraron que tanto el aceite esencial como la oleorresina poseen mayor poder antioxidante que el antioxidante sintético BHA. En esta investigación se sugiere que la actividad antioxidante de los extractos de jengibre puede deberse al efecto sinérgico de dos o más compuestos presentes en ellos.

5.2 Objetivo

En el Capítulo anterior se mostró que las fracciones de los residuos (componentes más pesados) obtenidos por destilación molecular presentaron mayor actividad antioxidante que el aceite esencial de romero. El objetivo en este capítulo es el de evaluar la estabilidad oxidativa del aceite de girasol enriquecido con fracciones de alto poder antioxidante obtenidas mediante destilación molecular del aceite esencial de romero.

5.3 Materiales y métodos

5.3.1 Materiales

Para los ensayos de almacenamiento se utilizó aceite de girasol refinado, marca "Natura" de AGD, General Deheza, Córdoba, Argentina.

El AER, variedad *Rosmarinus officinalis L.*, fue producido en Barreal, Calingasta, provincia de San Juan, Argentina, ubicado a 31° de latitud Sur, 69° 29'40" longitud oeste, a 1650 metros sobre el nivel del mar y fue cosechado en agosto de 2011.

Las fracciones de AER son las obtenidas por destilación molecular que se detallaron en el Capítulo 4.

5.3.2 Metodología

Test de estabilidad oxidativa

Este test de oxidación se realizó sobre muestras de aceite de girasol refinado enriquecidas con aceite esencial de romero y las fracciones obtenidas mediante la metodología de destilación molecular que arrojaron los valores más significativos en el test de captación de radicales libres, mostrado en el capítulo 4 de la presente tesis. Una muestra de aceite de girasol sin la adición de las diferentes fracciones se utilizó como control. Al mismo tiempo, el agregado de antioxidantes naturales (aceites esenciales y diferentes fracciones) se comparó con el agregado de un antioxidante comercial (BHT). El aceite esencial de romero y las fracciones se adicionaron en una concentración de 1000 ppm, mientras que el antioxidante comercial se añadió en una concentración de 200 ppm, por ser la concentración aceptada por el Código Alimentario Argentino (2001). Todos los ensayos y determinaciones se realizaron por triplicado. Un volumen de 8,5 ml de cada una de las muestras fue colocado en tubos de ensayo y se almacenaron a 23 °C (temperatura ambiente) por un período de 115 días. Las muestras fueron extraídas sin reposición en tiempo 0, 5, 15, 26, 46, 65 y 115 días de iniciado el ensayo. La identificación de las muestras se detalla a continuación:

AG: Aceite de girasol;

AGAER: Aceite de girasol enriquecido con aceite esencial de romero;

AGR1: Aceite de girasol enriquecido con la fracción de residuo de la etapa 1 de las destilaciones efectuadas en serie de 4 etapas;

AGR4: Aceite de girasol enriquecido con la fracción de residuo de la etapa 4 de las destilaciones efectuadas en serie de 4 etapas;

AGD4: Aceite de girasol enriquecido con la fracción de destilado de la etapa 4 de las destilaciones efectuadas en serie de 4 etapas;

AGBHT: Aceite de girasol enriquecido con antioxidante comercial BHT.

- **Análisis químico de las muestras almacenadas**

Para evaluar la oxidación de las muestras y seguir su evolución en el tiempo cada muestra fue sometida a los siguientes análisis químicos (realizados cada uno de ellos por triplicado):

- **Índice de Peróxido:** Este indicador fue evaluado de acuerdo al método 28.022 de la AOAC (1995). Se disolvieron 5 g de cada muestra en 30 ml de una solución de ácido acético-cloroformo preparadas en una proporción 3:2 v/v respectivamente. Se adicionaron 0,5 ml de una solución saturada de KI. Se dejó reposar durante 1 minuto. Luego se agregaron 30 ml de agua destilada y se procedió a titular con una solución 0,1 N de tiosulfato de sodio. Como indicador del punto final de la titulación se utilizó una solución de almidón al 1% m/v. El valor de índice de peróxidos de cada una de las muestras se determinó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$IP \text{ (meqO}_2\text{/Kgmuestra)} = \frac{S \cdot N \cdot 1000}{m}$$

Donde:

IP: Índice de peróxidos

S: Volumen en ml de solución de tiosulfato de sodio utilizado en la titulación.

N: Normalidad de la solución de tiosulfato de sodio.

m: masa en g de la muestra utilizada

- **Índice de dienos y trienos conjugados (DC y TC, respectivamente):** 0,2 g de cada muestra de aceite se disolvieron en 6 ml de n-hexano. La absorbancia de los dienos conjugados se midió a 232 nm y la de los trienos a 268 nm en un espectrofotómetro (UV-V Espectrofotómetro con arreglos de diodos Hewlett Packard HP 8452 A, USA), usando como blanco n-hexano. El resultado se informó como el coeficiente de extinción de la muestra E (1%, 1cm) (COI, 2001).

- **Análisis estadístico del test de estabilidad oxidativa**

Todos los experimentos fueron realizados en tres repeticiones. Se realizó análisis de varianza para evaluar el efecto de los tratamientos y el tiempo de almacenaje sobre

los valores de índices de peróxidos, dienos y trienos conjugados, utilizando el software estadístico InfoStat. Se seleccionaron como variables dependientes el índice de peróxidos, dienos y trienos conjugados y se fijaron como variables de clasificación el tiempo y tratamiento. Al modelo se incorporó la interacción tiempo*tratamiento, quedando planteado de la siguiente manera:

$$Y_{i,j,k} = \mu + \alpha_i + \tau_j + \varepsilon_{i,j} + \gamma_{i,j,k}$$

donde:

$Y_{i,j,k}$: respuesta que brinda el programa al análisis de varianza, para IP, DC y TC.

μ : media general

α_i : efecto del tiempo sobre la respuesta

τ_j : efecto de cada uno de los tratamientos (muestras analizadas)

$\varepsilon_{i,j}$: efecto de la interacción tiempo*tratamiento (error experimental)

$\gamma_{i,j,k}$: error de muestreo

Las diferencias significativas entre medias se determinaron mediante test posterior LSD, para un nivel de significatividad $\alpha = 0,05$.

Luego se realizaron análisis de regresión para cada variable química (IP, DC y TC) en función del tiempo de almacenaje de cada tratamiento. Se utilizó el modelo lineal simple: $y = \beta_0 + \beta_1x$, donde 'y' fue la variable dependiente (IP, DC y TC); y 'x' fue la variable independiente (tiempo). Se compararon los valores de las pendientes de las rectas de regresión mediante ANOVA y test posterior LSD ($\alpha = 0.05$) para determinar cuáles fueron los tratamientos con menores tendencias de deterioro.

5.4 Resultados y discusión

5.4.1 Test de estabilidad oxidativa

En las Figuras 5.1, 5.2 y 5.3 se presentan las evoluciones del IP, contenido de DC y de TC, respectivamente, analizados durante el almacenaje a 23 °C de las muestras AG, AGAER, AGR1, AGR4, AGD4 y AGBHT.

Índice de peróxido. Los valores de IP obtenidos durante el almacenaje a 23 °C (Figura 5.1) presentaron tendencia creciente en función del tiempo en todas las muestras a partir del día 15, es decir que todas ellas sufrieron algún grado de peroxidación durante este periodo de almacenaje. Esta tendencia fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en la muestra de aceite de girasol (control) con respecto a las muestras que se le adicionaron los distintos compuestos (BHT, aceite esencial de romero y sus concentrados AGAER, AGD4, AGR1 y AGR4). La muestra que presentó menor valor de IP en todo el almacenamiento fue AGBHT y la que presentó el mayor IP fue la muestra AG. Todas las muestras mostraron diferencias significativas a 115 días de almacenamiento; el orden creciente de valores de IP fue: AGBHT < AGR4 < AGR1 < AGAER < AGD4 < AG. Estos resultados reflejaron diferencias de estabilidad entre las muestras de aceite frente a los procesos de peroxidación. Se observó el efecto protector de las distintas fracciones de residuo y del AER en las muestras.

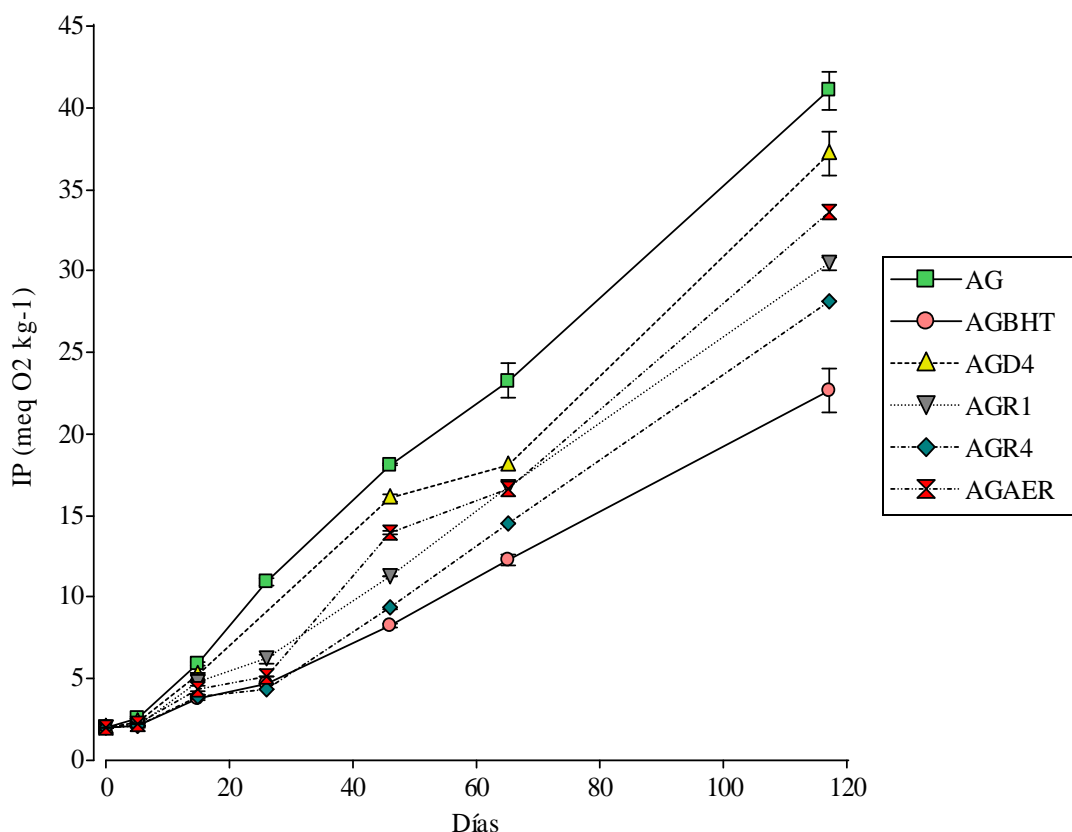


Figura 5.1: Evolución de los valores de IP de AER, distintas fracciones del mismo y antioxidante BHT sobre una matriz de aceite de girasol mantenido a 23 °C, durante 115 días.

Dienos conjugados. Todas las muestras presentaron diferencias significativas ($\alpha=0,05$) en los valores de DC durante el almacenamiento (Figura 5.2). Se observó similar comportamiento al IP. Los valores de DC más altos fueron para la muestra control (AG) y los valores más bajos fueron para la muestra con BHT (AGBHT). Los valores de DC se incrementaron durante el almacenamiento: de 3,16 - 13,18 en AG, 3,16 - 9,83 en AGD4, 3,14 - 9,07 en AGAER, 3,14 - 7,99 en AGR1, 3,16 - 7,00 en AGR4 y 3,14 - 5,90 en AGBHT. El orden creciente en los valores de DC fue AGBHT < AGR4 < AGR1 < AGAER = AGD4 < AG.

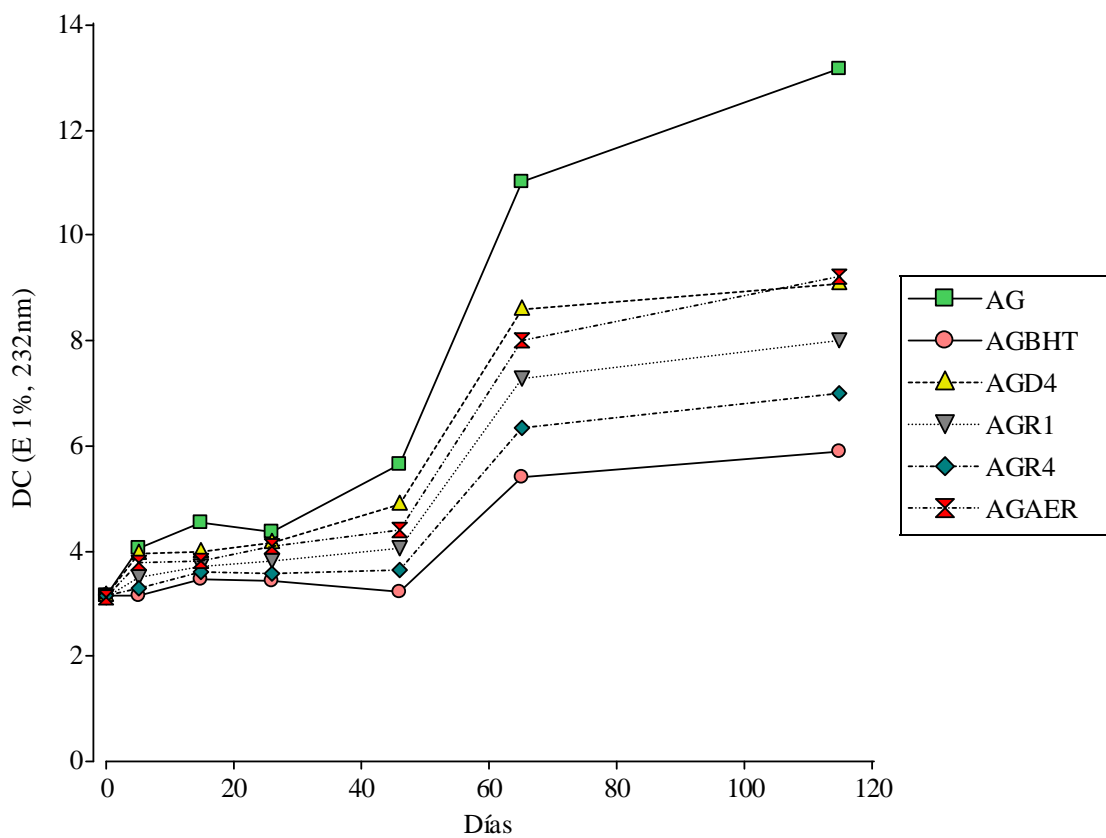


Figura 5.2: Evolución de los valores de DC de AER, distintas fracciones del mismo y antioxidante BHT sobre una matriz de aceite de girasol mantenido a 23 °C, durante 115 días.

Trienos conjugados. El contenido de TC se incrementó durante el almacenamiento: 1,85 - 4,99 en AG, 1,86-3,62 en AGAER, 1,85 - 3,29 en AGD4, 1,86 - 2,91 en AGR1, 1,86 - 2,24 en AGR4 y 1,85 - 2,05 en AGBHT (Figura 5.3). Las muestras AGR4 y AGBHT mostraron incremento insignificante durante el almacenaje.

La muestra AG (control) presentó los valores más altos de TC durante el almacenamiento.

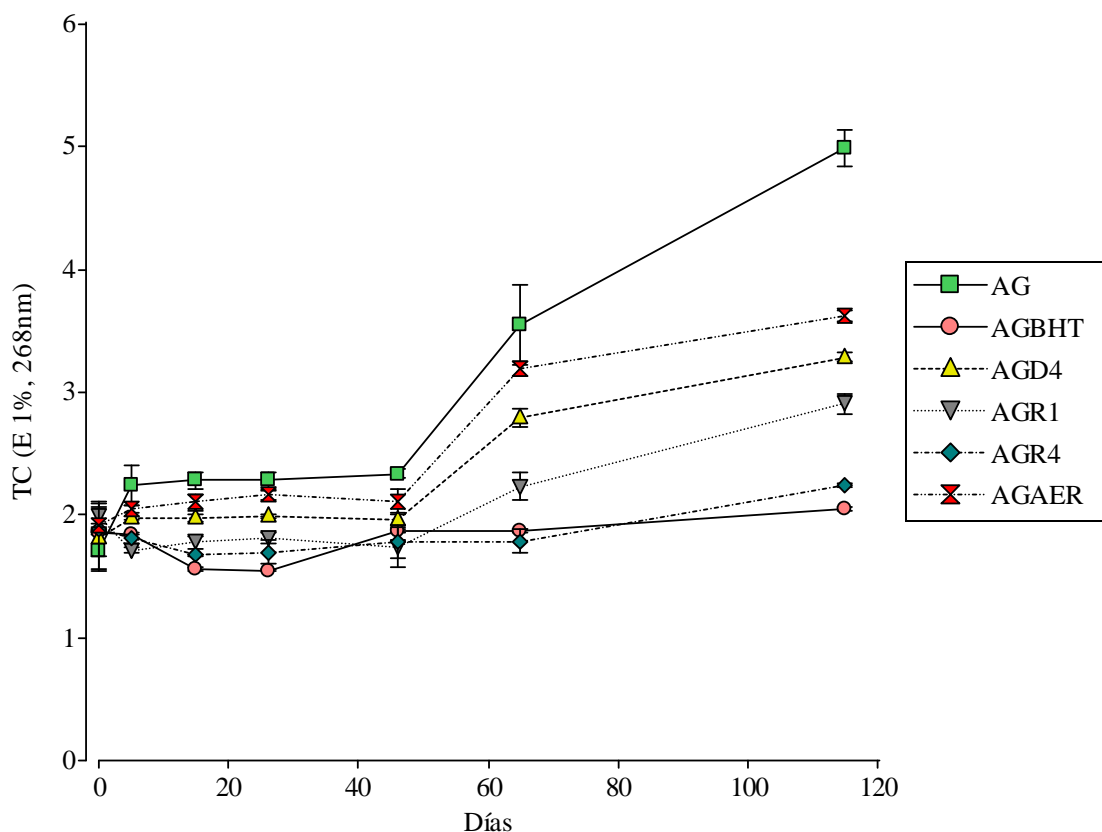


Figura 5.3: Evolución de los valores de TC de AER, distintas fracciones del mismo y antioxidante BHT sobre una matriz de aceite de girasol mantenido a 23 °C, durante 115 días.

En general, se observó un incremento de las variables químicas durante el tiempo de almacenamiento en todas las muestras. Las muestras de aceite de girasol con BHT y con las fracciones residuales (AGR1 y AGR4) mostraron menores valores de IP, DC y TC que las muestras con aceite esencial de romero y los destilados. Lo cual indica el mayor efecto antioxidante del BHT, AGR1 y AGR4 frente a la oxidación del aceite de girasol.

Olmedo y colab. (2008) estudiaron el efecto antioxidante de los aceites esenciales de laurel, de orégano y BHT sobre la estabilidad del maní frito salado. La adición de los

aceites esenciales al producto mostró una actividad antioxidante similar. A su vez, se le otorgó una mayor vida útil al maní frito salado.

Nieto y colab. (2010) examinaron la influencia de destilados a partir de la hoja de romero, en la dieta de ovejas preñadas, en la estabilidad a la oxidación, propiedades sensoriales y microbiología de la carne de cordero almacenado en atmósfera modificada. La carne de los corderos de las ovejas alimentadas con destilado de hojas de romero presentaron niveles más bajos de: oxidación de lípidos, de recuentos microbiológicos totales y una mayor estabilidad de color durante los 21 días de almacenamiento en envases con atmósfera modificada.

Análisis de regresión lineal

Con los resultados obtenidos de las variables químicas en función del tiempo de cada muestra (AG, AGAER, AGR1, AGR4, AGD4 y AGBHT) a 23 °C se realizaron análisis de regresión utilizando un modelo lineal simple, considerando como variables dependientes las variables químicas (IP, DC y TC) en función de la variable independiente tiempo de almacenaje. Los coeficientes de regresión se muestran en la Tabla 5.1.

Las variables relacionadas con la oxidación lipídica (IP y DC) mostraron pendientes positivas, lo que indica un aumento lineal con el tiempo de almacenamiento. En el caso de TC las muestras AGR1, AG, AGD4 y AGAER, también presentaron pendientes positivas. BHT y R4 exhibieron los valores más bajos de R^2 , valores de 0,457 y 0,269.

Los análisis de regresión para la variable IP resultaron con $R^2 > 0,98$ para todos los tratamientos, indicando muy buen ajuste del modelo con los datos experimentales. Por lo tanto, esta ecuación de regresión se puede utilizar para predecir el efecto del tiempo de almacenamiento a 23 °C en los aceites de girasol. Además, esta variable mostró diferencias significativas en las pendientes de regresión entre las muestras. Las muestras AG y AGD4 tuvieron la mayor tasa de incremento de IP (mayores pendientes) al ser comparadas con los otros productos. Esta fracción de destilado mostró menor capacidad antioxidante que las fracciones de residuos. Además, AGBHT mostró la

menor pendiente. Estos resultados indican que BHT y los residuos R1 y R4 poseen mejores propiedades antioxidantes que el aceite de romero y el destilado (D4).

En cuanto a los DC y TC, las muestras AG y AGD4 mostraron las mayores tasas de incremento para estas variables que las otras muestras.

Tabla 5.1: Coeficientes estimados β_0 y β_1 , y R^2 del análisis de regresión lineal simple para las variables IP, DC y TC en función del tiempo de almacenaje de las muestras analizadas.

Variable dependiente	Muestra	Coeficientes de regresión lineal ^a			
		β_0	β_1	*	R^2
IP	AGBHT	0,53695	0,18259	a	0,987
	AGR4	-0,12733	0,23249	b	0,984
	AGR1	0,46433	0,24963	bc	0,993
	AGAER	-0,01202	0,27823	cd	0,982
	AGD4	0,72973	0,30563	d	0,989
	AG	1,18300	0,34150	e	0,997
DC	AGBHT	2,91034	0,02642	a	0,806
	AGR4	2,87534	0,03664	ab	0,831
	AGR1	2,93000	0,04541	bc	0,862
	AGAER	2,99168	0,05463	c	0,864
	AGD4	3,08847	0,06194	c	0,886
	AG	2,94538	0,09165	d	0,901
TC	AGBHT	1,67600	0,00302	a	0,457
	AGR4	1,71061	0,00300	a	0,269
	AGR1	1,62800	0,00902	b	0,669
	AGAER	1,76254	0,01215	bc	0,783
	AGD4	1,73483	0,01658	c	0,825
	AG	1,71622	0,02637	d	0,883

^aCoeficientes de regresión para la ecuación general de regresión: $y = \beta_0 + \beta_1 \cdot x$, donde y = variable dependiente (IP, DC y TC) y x = variable independiente (días de almacenamiento).

*Diferentes letras indican diferencias significativas entre las pendientes de las regresiones lineales para las distintas variables, ANOVA y test posterior LSD ($\alpha = 0,05$).

Según el Código Alimentario Argentino (2001), el nivel máximo de IP permitido para los aceites comestibles es de 10 meqO₂/kg. Este valor límite puede ser utilizado para determinar la vida útil del aceite de girasol con el agregado de los diferentes compuestos. En la Tabla 5.2 se presenta el tiempo que debe transcurrir para alcanzar este valor de 10 meqO₂/kg para cada muestra y se muestra la relación entre los días de vida útil del aceite de girasol con el agregado de cada muestra y los días de vida útil del aceite de girasol sin agregado.

Tabla 5.2: Vida útil del aceite de girasol con el agregado de las distintas muestras.

Muestra	Vida útil (días)	Relación de vida útil*
AG	55	1,00
AGD4	63	1,14
AGAER	70	1,29
AGR1	78	1,42
AGR4	87	1,57
AGBHT	107	1,93

*Relación entre los días de vida útil del aceite de girasol con el agregado de cada muestra y los días de vida útil del aceite de girasol sin agregado.

Con el agregado de AER se mejoró la vida útil del aceite de girasol logrando un aumento de la misma en un 29 %, mientras que con el agregado de los residuos, R1 y R4 se obtuvieron aumentos del 42 y 57 % respectivamente, ambos valores muy superiores al del AER siendo el de R4 aproximadamente el doble del de AER. El aceite de girasol adicionado con BHT casi duplicó la vida útil del aceite de girasol.

Estos resultados pueden ser integrados con los del capítulo anterior, los residuos obtenidos en el proceso de destilación molecular presentaron los valores de EC₅₀ y de IP más pequeños, demostrando mayor poder antioxidante que el AER y los destilados. Según el análisis de componentes principales realizado entre los valores de EC₅₀ y los compuestos presentes en las fracciones se concluyó que los compuestos asociados a mayor actividad antioxidante en las fracciones analizadas son α -terpineol y cis-sabineno hidrato, ambos compuestos son monoterpenos oxigenados.

En concordancia con estos resultados, Bozin y colab. (2007) determinaron los componentes de aceite esencial de romero (AER) y de salvia (AES), y sus actividades microbiológicas y antioxidantes. La actividad antioxidante fue evaluada como la capacidad de captación de radicales libres (CRL), junto con el efecto de la peroxidación lipídica (LP). El AER contenía principalmente monoterpenos hidrocarbonados: limoneno (21,7 %) y alfa-pineno (13,5 %); monoterpenos oxigenados: alcanfor (21,6 %) y cis-linalol óxido (10,8 %). Además contenía borneol (6,2 %), canfeno (3,9 %), sabineno (2 %), 1,8-cineol (2,1 %) y α -terpineol (1,9 %). Los valores de EC₅₀ para estas muestras fueron 3,82 μ l/ml para el AER, 1,78 μ l/ml para el AES y 5,37 μ l/ml para el antioxidante comercial BHT. En el trabajo destacan que los componentes mayormente responsables de la neutralización de los radicales DPPH[•] son los monoterpenos oxigenados y la mezcla de sesquiterpenos carbonados.

Beretta y colab. (2011) estudiaron el AER producido en 3 momentos distintos de cosecha del mismo (en la floración, después de la floración y en estado vegetativo), por diferentes métodos antioxidantes. Además separaron en fracciones el AER a partir de extracciones sobre una fase sólida con diferentes solventes. El poder antioxidante lo determinaron mediante la técnica de captación del radical libre DPPH[•], y mediante el contenido de Fe reducido usando el ensayo de Folin-Ciocalteu y el método de azul Prusia y midiendo la actividad anti-lipoperoxidante, mediante el método TBARS. Al determinar el poder antioxidante de las tres variedades de AER, la que presentó mayor poder antioxidante fue el AE producido a partir de romero cosechado en la etapa de floración. La composición de estas tres variedades fue distinta entre sí. Al fraccionar los AER obtuvieron: la fracción 1, eluida con n-pentano, que presentó monoterpenos no oxigenados; la fracción 2, producto de la elución con n-pentano/dietiléter 95:5, que presentó cetonas, ésteres y residuos de monoterpenos no oxigenados; la fracción 3, eluida con dietiléter, que contuvo éteres y alcoholes (1,8-cineol, borneol, linalol, terpinen-4-ol, α -terpineol, 6-canfenol, geranil alcohol, carveol, isopulegol, dihidrocarveol), además de fenoles (carvacrol y timol) y residuos de cetonas, y al eluir la muestra con etanol, fracción 4, no se recuperaron especies polares. Las fracciones 1 y 2 de las 3 variedades de aceites esenciales arrojaron valores no legibles o muy pequeños de actividad antioxidante. La fracción 3 si presentó actividad antioxidante, siendo la

variedad producida en la etapa de floración la que presentó mayor poder antioxidante. Los autores atribuyen el poder antioxidante a los éteres, alcoholes y compuestos fenólicos presentes en el AER obtenido a partir de la etapa de floración de la planta de romero.

5.5 Conclusiones

Los resultados del presente trabajo muestran que la adición de las fracciones de aceite esencial de romero, obtenidas mediante destilación molecular, al aceite de girasol mejora la estabilidad del producto previniendo la oxidación de los ácidos grasos insaturados.

Las fracciones de residuos presentaron los menores valores de IP, DC y TC, lo que demuestra su mayor actividad antioxidante.

Dichas fracciones podrían ser utilizadas como antioxidante natural, incrementando la vida útil, mejorando la estabilidad y previniendo la pérdida de la calidad sensorial y nutricional de este tipo de productos alimenticios de alto contenido de lípidos.

CAPÍTULO 6

Modelado de la destilación molecular de aceite esencial de romero mediante Redes Neuronales Artificiales

En este capítulo se presentan los resultados del modelado de la operación de destilación molecular utilizando redes neuronales artificiales. Se han utilizado los resultados obtenidos de los ensayos de destilación molecular llevados a cabo para obtener distintas fracciones de aceite esencial de romero. Mediante la aplicación de redes neuronales artificiales se realiza la predicción del porcentaje de destilado obtenido en función de las condiciones operativas, presión de operación y flujo de alimentación en la operación de destilación molecular.

6.1 Introducción teórica

La **Inteligencia Artificial** es una rama en la ciencia de la computación, de reciente aparición, que intenta descubrir y describir aspectos de la inteligencia humana que pueden ser simulados mediante máquinas.

Las **Redes Neuronales Artificiales** (ANN por sus siglas en inglés *Artificial Neural Network*) se corresponden con un área de estudio dentro de la Inteligencia Artificial y pueden entenderse como una forma de emular ciertas características propias de los humanos, como la capacidad de memorizar y de asociar hechos (Fausett, 1994).

El humano es capaz de resolver situaciones complejas mediante lo que comúnmente se conoce como experiencia. Se llama experiencia a toda enseñanza adquirida por medio de acontecimientos transcurridos en el pasado como, por ejemplo, la capacidad del ser humano de reconocer objetos mediante el recuerdo y asociación de patrones aprendidos tiempo atrás.

De esta manera una forma de aproximarse al problema consiste en la construcción de sistemas que sean capaces de reproducir la capacidad humana de emplear la experiencia en la resolución de problemas complejos.

Las Redes Neuronales no son más que un modelo artificial y simplificado del cerebro humano, que es el ejemplo más perfecto que se dispone para un sistema que es capaz de adquirir conocimiento a través de la experiencia.

Una red neuronal es un nuevo sistema para el tratamiento de la información, cuya unidad básica de procesamiento está inspirada en la célula fundamental del sistema nervioso humano: la neurona (Quantrille y Liu; 1991; Hertz y colab., 1993; Bishop, 1995; Hilera y Martínez, 1995; Randall y colab., 2000).

Las características especiales de los sistemas de computación neuronal permiten que esta nueva técnica de cálculo sea utilizada en una extensa variedad de aplicaciones. A continuación se presentan conceptos básicos relacionados a las Redes Neuronales. Se presentan aspectos generales como las características principales que definen una red neuronal, las arquitecturas conocidas, las funciones de activación y los algoritmos de entrenamiento.

Se abordará un tipo de red neuronal en particular denominado *feedforward backpropagation* ya que este modelo será el empleado en la representación de los datos experimentales obtenidos en el proceso de destilación molecular del AER.

6.1.1 Conceptos básicos de las redes neuronales

Una ANN es un sistema de procesamiento de información que tiene ciertas características en común con las redes neuronales biológicas (Fausett, 1994).

Las ANN han sido desarrolladas como una generalización de modelos matemáticos que emulan el funcionamiento del cerebro humano en los siguientes aspectos:

- ✓ El procesamiento de la información no se realiza en una única unidad de procesamiento si no que ocurre en múltiples elementos denominados **neuronas**.
- ✓ Las señales se pasan de neurona a neurona a través de **enlaces de conexión**.
- ✓ Cada enlace entre neuronas tiene un **peso** asociado, el cual, en una red típica, multiplica la señal transmitida.
- ✓ Cada neurona aplica una **función de activación** (usualmente no lineal) a la suma de sus entradas ponderadas por los pesos para determinar la señal de salida.

Una red neuronal consiste de un gran número de elementos de procesamiento simple, llamados neuronas, unidades, celdas o nodos. Cada neurona se conecta a otra por medio de enlaces de comunicación y cada enlace tiene asociado un determinado peso. Este peso representa la información que va a ser utilizada por la red para resolver el problema.

Cada neurona tiene asociado un estado denominado activación o nivel de actividad el cual, a su vez, es función de sus entradas. Es importante destacar que una neurona puede enviar solamente un estado o nivel al mismo tiempo a una o más neuronas.

Al considerar una neurona que ocupe la posición k dentro de una determinada arquitectura, como la ilustrada en la Figura 6.1 se observa que recibe información proveniente de sus n entradas. Cada valor x_i puede tratarse de un valor de entrada a la red neuronal o bien de la salida de una neurona de capas anteriores. Esto dependerá de la arquitectura y la posición de la k -ésima neurona dentro de la red. Los pesos w_{ki} representan la relevancia de la i -ésima conexión de la k -ésima neurona.

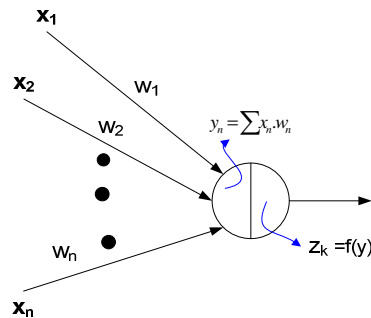


Figura 6.1: Esquema de una neurona

Cada k -ésima neurona combina cada entrada x_i con sus correspondientes pesos w_{ik} determinando una salida descrita por:

$$y_k = \bar{x} \cdot \bar{w} = \sum_{i=1}^n x_i w_i \quad (6.1)$$

El resultado de esta ecuación representa la entrada a una función denominada función de transferencia. La sección 6.4 detalla algunas de las funciones de transferencia comúnmente empleadas.

La elección de la función de transferencia representa uno de los parámetros fundamentales del diseño de la red neuronal. Las funciones de transferencia más comúnmente empleadas son: función lineal, sigmoidea, sigmoidea logarítmica, umbral y gaussiana.

De suponer, por ejemplo, que la neurona z se conecta a dos neuronas m_1 y m_2 a través de dos conexiones cuyos pesos son v_1 y v_2 , respectivamente, se establece la arquitectura mostrada en la Figura 6.2.

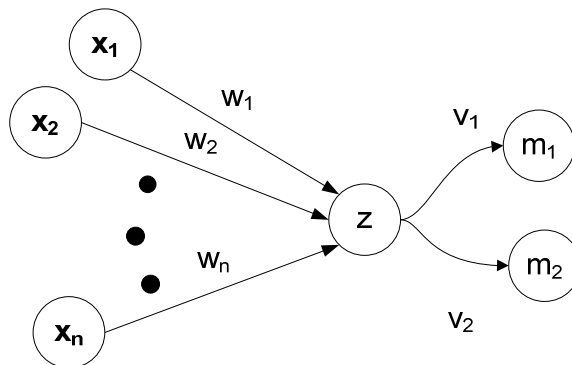


Figura 6.2: Conexión entre neuronas

El nivel de activación de la neurona m_1 no será igual al de la neurona m_2 debido a que es altamente probable que los pesos de las conexiones v_1 y v_2 sean diferentes. La salida de la neurona m_1 estará dada por la suma de las entradas multiplicadas por los pesos de las conexiones, y procesadas con una determinada función de activación.

Para definir el comportamiento de la red los pesos de las conexiones de todas las neuronas se ajustan mediante métodos denominados **algoritmos de entrenamiento**.

Este ejemplo presenta una primera idea de cómo una red neuronal se caracteriza por:

- a) **Arquitectura de la red:** patrón de conexión entre cada neurona
- b) **Algoritmo de entrenamiento:** Método por el cual se ajustan los pesos de las conexiones entre neuronas
- c) **Función de activación:** Función lineal o no lineal con que cada neurona responde ante los estímulos en las conexiones conocidas como entradas.

6.1.2 Similitudes con las redes neuronales biológicas

Existe una analogía cercana entre la estructura de una neurona biológica y el elemento de procesamiento de una ANN.

Una neurona biológica tiene tres tipos de componentes que tienen un particular interés en el entendimiento de una red neuronal biológica. Tal como se pueden ver en la Figura 6.3 estas son: Dendrita, Soma y Axón.

Las múltiples neuronas reciben señales de otras neuronas. Estas señales se corresponden con impulsos eléctricos que son transmitidos a través del axón y las dendritas hacia otra neurona.

✓ El soma, también llamado cuerpo celular, suma las señales que ingresan a través de todas las dendritas. Cuando la suma de las señales de la entrada llega a un determinado nivel la célula se enciende y transmite una señal a través del axón hacia las neuronas vecinas. Los elementos de procesamiento reciben múltiples señales de entrada.

✓ Las señales pueden ser modificadas por un peso en la neurona receptora.

- ✓ Los elementos de procesamiento suman las entradas.
- ✓ Bajo determinadas circunstancias (suficiente nivel de entrada), las neuronas transmiten una salida.
- ✓ La salida de una neurona puede ir a otra neurona a través del axón.
- ✓ La información se procesa localmente.
- ✓ La memoria es distribuida.
- ✓ La memoria a largo plazo reside en la sinapsis de las neuronas.
- ✓ La memoria a corto plazo se corresponde con las señales enviadas por las neuronas.
- ✓ El vínculo sináptico entre dos neuronas se modifica con la experiencia

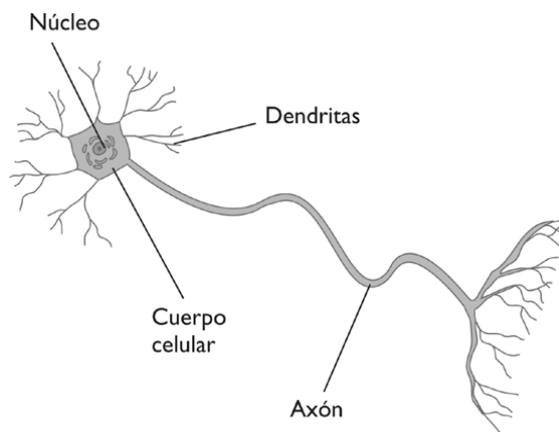


Figura 6.3: Neurona biológica

6.1.3 Características de las redes neuronales

Las ANN al margen de "parecerse" al cerebro presentan una serie de características propias del cerebro. Por ejemplo las ANN aprenden de la experiencia, generalizan ejemplos previos aplicándolos a ejemplos nuevos y abstraen las características principales de una serie de datos. Algunas de las características más importantes son:

Aprendizaje Adaptativo

Capacidad de adquirir el conocimiento de un problema por medio del estudio, ejercicio o experiencia. Las ANN pueden cambiar su comportamiento en función del entorno. Se les presenta un conjunto de entradas y ellas mismas se ajustan para producir salidas consistentes.

Generalización

Es la facultad de las Redes Neuronales de responder apropiadamente cuando se les presentan datos o situaciones a las que no había sido expuesta anteriormente. Esta característica es muy importante cuando se tiene que solucionar problemas en los cuales la información de entrada no es muy clara; además permite que el sistema dé una solución, incluso cuando la información de entrada está especificada de forma incompleta.

Tolerancia a fallas

Las Redes Neuronales fueron los primeros métodos computacionales con la capacidad inherente de tolerancia a fallas. Comparados con los sistemas computacionales tradicionales, los cuales pierden su funcionalidad cuando sufren un pequeño error de memoria, en las Redes Neuronales, si se produce un fallo en un número no muy grande de neuronas y aunque el comportamiento del sistema se ve influenciado, no sufre una caída repentina.

Abstracción

Las ANN pueden considerar por separado las cualidades de un dato. Algunas ANN son capaces de abstraer la esencia de un conjunto de datos de entrada que aparentemente no presentan aspectos comunes o relativos.

Auto-organización

Una red neuronal puede crear su propia organización o representación de la información que recibe mediante una etapa de aprendizaje.

Operación en tiempo real

Los cálculos neuronales pueden ser realizados en paralelo; para esto se diseñan y fabrican máquinas con hardware especial para obtener esta capacidad.

Fácil inserción dentro de la tecnología existente

Se pueden obtener chips especializados para Redes Neuronales que mejoran su capacidad en ciertas tareas. Ello facilitará la integración modular en los sistemas existentes.

Arquitectura de las redes neuronales

Es común representar a las Redes Neuronales como un conjunto de neuronas agrupadas en una o más capas. Cada neurona dentro de una capa se comporta de una manera similar.

La arquitectura de un modelo de redes neuronales debe ser determinada para cada problema específico y su desempeño depende fuertemente de dicha estructura (Peroni, 2002).

Es importante destacar que los factores que priman a la hora de determinar el comportamiento de una neurona son su función de transferencia y los valores de los pesos de las conexiones con las neuronas vecinas. Usualmente, dentro de una misma capa, las neuronas presentan la misma función de activación y el mismo patrón de conexión con las neuronas vecinas. El arreglo de las neuronas en capas y el patrón de conexión entre capas se denomina **arquitectura de la red**. En la mayoría de las

arquitecturas las neuronas de entrada a la red se activan directamente con el valor de los patrones o señales de entrada.

Las ANN usualmente se clasifican de acuerdo al número de capas como mono capa y multicapa. En el cálculo del número de capas de una arquitectura de una ANN la capa de entrada no se computa ya que las neuronas de esta capa no realizan ningún cómputo. La Figura 6.4 ilustra una ANN mono capa y la Figura 6.5 ilustra una ANN multicapa.

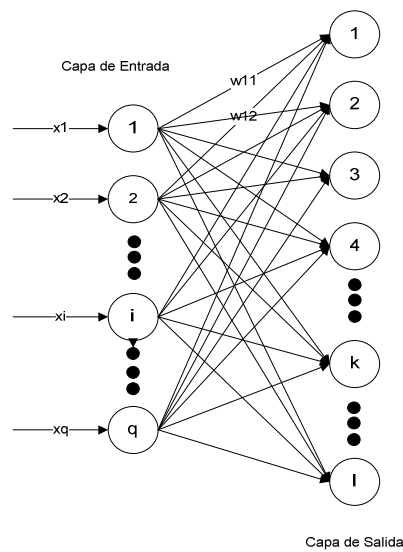


Figura 6.4: Red Neuronal Monocapa

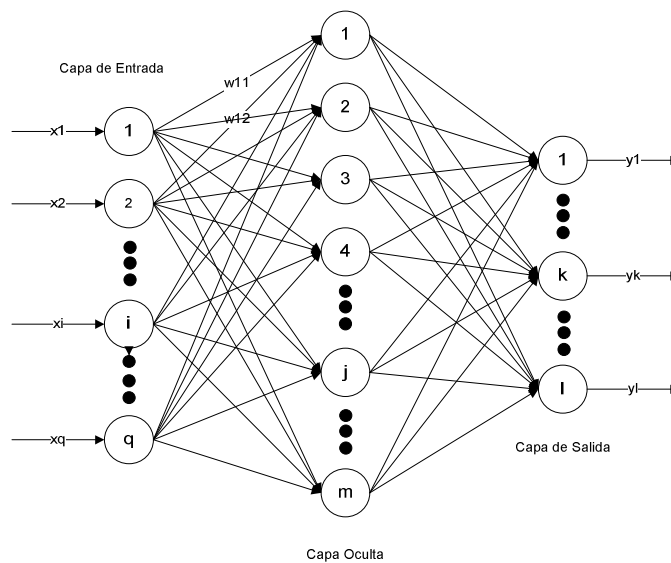


Figura 6.5: Red Neuronal Multicapa

- **Redes Monocapa**

En la red mono capa presentada en la Figura 6.4 cada neurona de la capa de entrada está conectada con todas las neuronas de la capa de salida pero no existen conexiones entre las neuronas de la capa de entrada y tampoco las neuronas de la capa de salida se encuentran interconectadas entre sí. Existe una arquitectura donde cada neurona de la capa de salida se conecta con todas las neuronas de esta capa. Esta configuración da a lugar a lo que se llama red competitiva.

- **Redes Multicapa**

Tal como muestra la Figura 6.5 una red multicapa está compuesta por una capa de entrada, una o más capas ocultas y una capa de salida. Las ANN multicapa pueden resolver con éxito problemas que las redes monocapa no son capaces de solucionar, sin embargo el entrenamiento de estas redes es muchas veces más complejo.

Ajuste de los pesos y métodos de entrenamiento

En la sección anterior se puso en relieve la importancia de la arquitectura de una red neuronal a la hora de determinar su comportamiento. Además de la arquitectura de la red, la forma en que se calculan los pesos representa un factor característico importante para definir el comportamiento de la ANN. Se llama **entrenamiento** al proceso por medio del cual los pesos de cada capa de la ANN son ajustados con el objetivo que la red **aprenda** a resolver un determinado problema. El entrenamiento de la red neuronal reforzará los pesos de las conexiones que favorecen a la convergencia hacia la solución deseada, disminuyendo los pesos de las conexiones que hacen que la red se aleje del resultado esperado. El ajuste de los pesos se realiza de manera iterativa empleando un criterio provisto por el algoritmo de entrenamiento. La etapa finaliza cuando los pesos se estabilizan en un determinado valor que puede o no ser el valor apropiado.

La red se encontrará en condiciones de realizar las tareas para la cual fue entrenada solo cuando la fase de aprendizaje haya finalizado. Si los pesos no se

modifican mientras la red está operativa se dice que la modalidad de entrenamiento es *off-line*. Del mismo modo, si los pesos son modificados aún cuando la red se encuentra operando, decimos que la modalidad de entrenamiento es *on-line*.

Por conveniencia se definen dos tipos de entrenamiento: Entrenamiento supervisado y entrenamiento no supervisado.

- **Entrenamiento supervisado**

Es el tipo de entrenamiento más comúnmente seleccionado para ajustar los pesos de la neurona. El entrenamiento supervisado se caracteriza porque el proceso de aprendizaje se realiza mediante un entrenamiento controlado por un agente externo que determina que respuesta debería entregar la red ante una determinada entrada. El supervisor controla la salida de la red y, en caso que la salida no coincida con la respuesta esperada, se modifican los pesos de la red de manera que la salida obtenida se aproxime a la salida deseada. Por este motivo se debe contar con un vector que contenga los valores de entrada asociado a un segundo vector que contenga los resultados esperados. A este par de vectores se los conoce como **set de entrenamiento**. Los tres tipos de entrenamiento supervisado más comunes son:

Aprendizaje por corrección de error. Consiste en ajustar los pesos de las conexiones de la red en función de la diferencia entre los valores deseados y los obtenidos a la salida, es decir, en función del error cometido en la salida. Esta técnica de ajuste de pesos puede encontrarse en la regla de aprendizaje del Perceptron, la regla del mínimo error cuadrático (LMS) y la regla empleada por las redes *Backpropagation* denominada LMS multicapa.

Aprendizaje por refuerzo. Se basa en la premisa de no disponer de un ejemplo completo del comportamiento deseado. Es decir, en no indicar durante el entrenamiento exactamente la salida deseada. En esta técnica, la función del supervisor es la de indicar mediante una señal de refuerzo si la salida obtenida en la red se ajusta a la salida

deseada (éxito = 1 o fracaso = -1) y en función de ello se ajustan los pesos basándose en un mecanismo de probabilidades.

Aprendizaje estocástico. Consiste básicamente en realizar cambios aleatorios en los valores de los pesos de las conexiones de red y evaluar su efecto a partir del objetivo deseado y de distribución de probabilidad. El algoritmo realiza un cambio aleatorio de los valores de los pesos y determina la energía de la red. Si la energía es menor después del cambio, es decir, si el comportamiento de la red se aproxima al deseado, se acepta el cambio. Si, por el contrario, la energía es mayor, se aceptaría el cambio en función de una determinada y preestablecida distribución de probabilidad.

- **Entrenamiento no supervisado**

El entrenamiento no supervisado es típico de las redes denominadas auto organizadas. Una red auto organizada agrupa patrones de entrada de acuerdo a su similitud sin necesidad que un agente externo le indique los resultados esperados. En consecuencia, el set de entrenamiento no contendrá información relativa a las salidas deseadas. En este tipo de redes los pesos son ajustados de tal forma que las entradas más similares entre sí sean asignadas a la misma salida (*clúster*). Dentro de las redes que utilizan este tipo de entrenamiento se encuentran las *Kohonen – Self Organizing Maps* (SOM) y las redes adaptivas que emplean la teoría de la resonancia.

Funciones de activación

Como ya se mencionó anteriormente, la arquitectura, el método de entrenamiento y la función de activación de las neuronas son los tres parámetros que definirán el comportamiento de la ANN. En las siguientes sub secciones se presentan las funciones de activación más comúnmente empleadas.

- **Función identidad**

Esta función es generalmente empleada en la capa de entrada de toda red neuronal. En la mayoría de los casos, para poder alcanzar las ventajas de una

arquitectura multicapa, las funciones de activación no lineal son requeridas. La ecuación que rige esta función de activación es:

$$f(x) = x \quad \forall x \quad (6.2)$$

La Figura 6.6 muestra la función de transferencia aquí presentada.

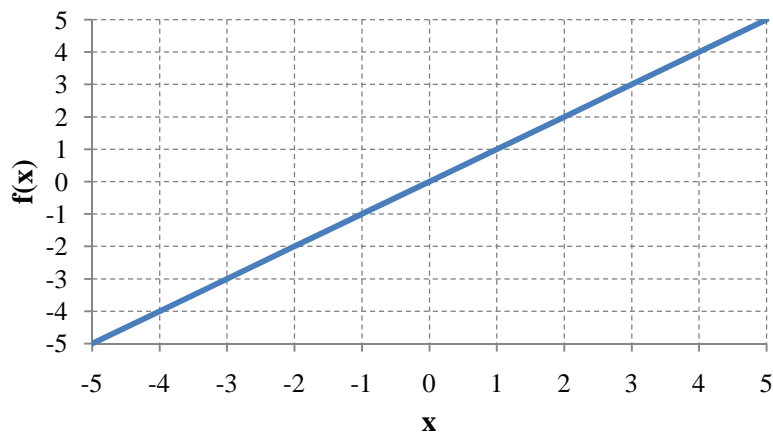


Figura 6.6: Función de activación lineal

- **Función escalón**

Las Redes Neuronales monocapa usualmente emplean este tipo de función de activación para convertir la entrada de la red, la cual suele ser una función continua, en una función de salida binaria. Esta conversión se realiza por medio de un umbral. Si la suma de las entradas ponderadas de una neurona supera un cierto umbral, la salida de la neurona se activa con un 1. Por el contrario, si la suma ponderada de las entradas de la neurona es menor que el valor del umbral la salida de la neurona estará en un valor inactivo, el cuál puede ser 0 ó -1, dependiendo de la convención utilizada. La ecuación que gobierna esta función de activación se presenta a continuación: y en la Figura 6.7 se muestra la función escalón.

$$f(x) = \begin{cases} 1 & \text{Si } x \geq \emptyset \\ -1 & \text{Si } x \leq \emptyset \end{cases} \quad (6.3)$$

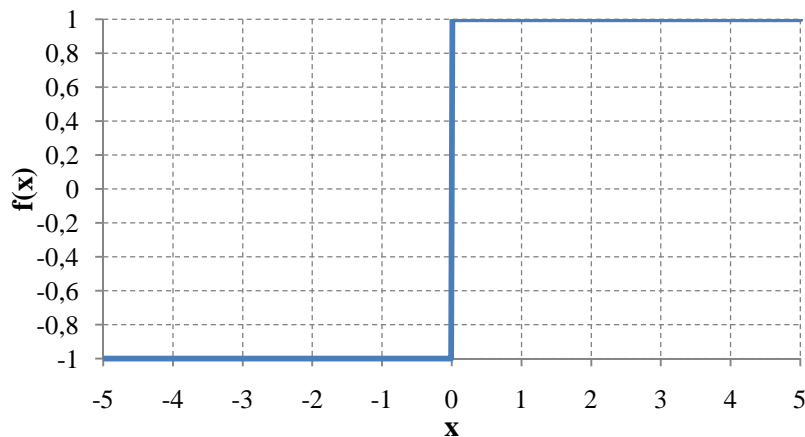


Figura 6.7 Función de activación escalón

- **Función sigmoide binaria**

La principal característica de las funciones sigmoide (funciones con forma de S) es que pertenecen a las denominadas funciones suaves o funciones de derivada continua. Esta característica es muy importante cuando se implementan algoritmos de entrenamiento que implican la derivada de la función de transferencia de la red neuronal. La función sigmoide binaria, también llamada función logística, es una función que varía suavemente desde el valor 0 al valor 1. La función sigmoide binaria se representa mediante la siguiente ecuación:

$$f(x) = \frac{1}{1 + \exp(-ax)} \quad (6.4)$$

La Figura 6.8 muestra la influencia del valor de a en la forma de la función.

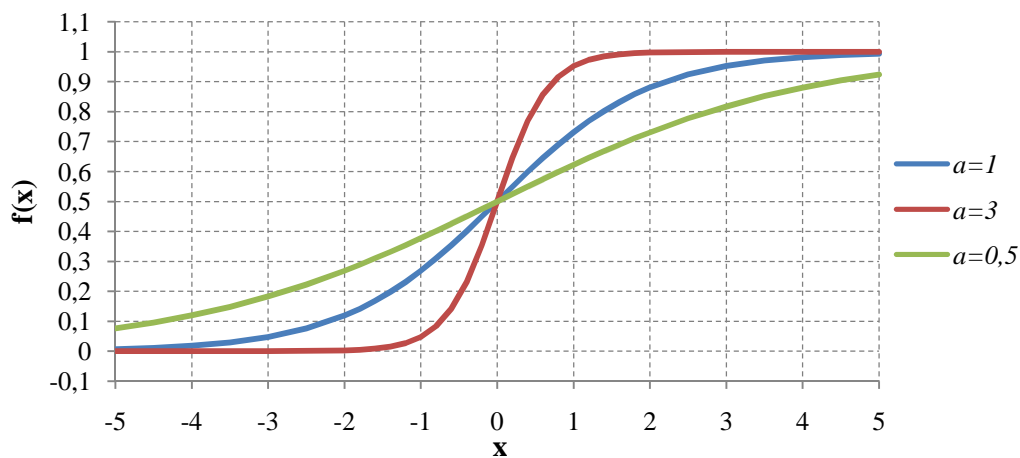


Figura 6.8: Función de activación sigmoide binaria

- Función sigmoide tangente hiperbólica

La función tangente hiperbólica es una función análoga a la función sigmoide binaria pero se utiliza para representar una transición suave en el rango que abarca desde -1 a 1, razón por la cual también es llamada bipolar. La ecuación empleada para representar esta función es:

$$f(x) = \frac{\exp(ax) - \exp(-ax)}{\exp(ax) + \exp(-ax)} \quad (6.5)$$

Esta función es representada en la Figura 6.9 para distintos valores de a .

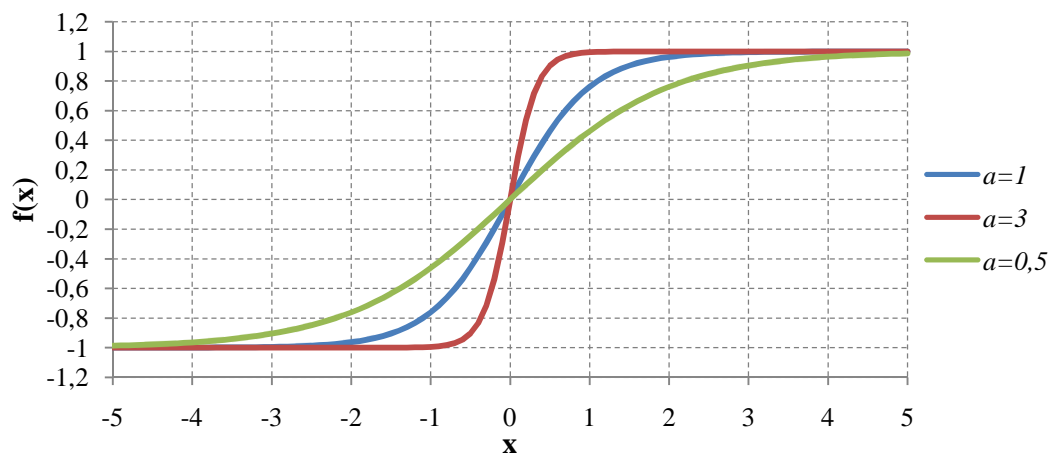


Figura 6.9: Función de activación sigmoide tangente hiperbólica

6.1.4 Red neuronal *Backpropagation*

Si bien existe una extensa variedad de Redes Neuronales que fueron diseñadas para resolver una amplia gama de problemas no es objetivo de este trabajo ser exhaustivo en la presentación de todos los tipos de Redes Neuronales. En esta sección solo se presentará la red neuronal *feedforward backpropagation* la cual ha probado ser eficiente al momento de asociar un patrón de entrada con un determinado patrón esperado a la salida. Estas Redes Neuronales deben su nombre al método de entrenamiento denominado como *backpropagation* (propagación hacia atrás) o *generalized delta rule* (regla delta generalizada).

Una red neuronal *backpropagation* es una red de propagación hacia delante (*feedforward*) multicapa entrenada con el algoritmo *backpropagation*. El algoritmo *backpropagation* se trata de un método de gradiente descendiente para minimizar el error cuadrático de la salida computada por la red. Este tipo de redes se puede encontrar en cualquier campo donde se empleen Redes Neuronales para resolver problemas que involucran la asociación de patrones.

La asociación de patrones implica que la red neuronal aprenda a tomar decisiones sobre cuál será el patrón de salida más apropiado ante un determinado patrón de entrada. Debido a esto, el tipo de entrenamiento necesariamente es supervisado y se debe contar con un set de patrones de entrada con su correspondiente set de patrones de salida.

Como en la mayoría de las Redes Neuronales, el objetivo del entrenamiento es alcanzar un balance entre la habilidad de responder correctamente a un patrón de entrada empleado en el entrenamiento (memorización) y la habilidad para dar una respuesta razonable a entradas similares pero no idénticas usando el entrenamiento (generalización).

Como veremos más adelante, el entrenamiento de una red neuronal consiste en las siguientes etapas: La propagación hacia delante de los patrones de entrenamiento en la red, el cálculo de la diferencia entre la respuesta de la red y la respuesta esperada, la propagación del error hacia atrás y el ajuste de los pesos en dirección a aproximar la respuesta de la red a la respuesta esperada.

Arquitectura de la red Backpropagation

La Figura 6.10 muestra la arquitectura de una red multicapa compuesta por una capa de entrada (Unidades X), una única capa oculta (Unidades Z), una capa de salida (Unidades Y), un bias en la capa oculta y un segundo bias en la capa de salida.

Los bias en la capa de salida Y_k se denotan por w_{0k} y los bias en la capa de oculta Z_k se denotan por v_{0k}

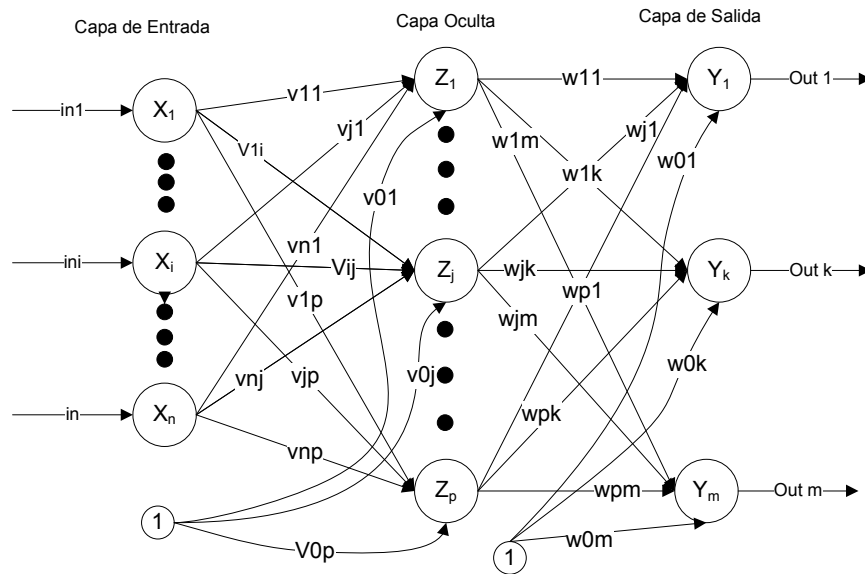


Figura 6.10: Arquitectura de una red multi-capas

Funciones de activación

La función de activación de una red *backpropagation* debe cumplir como condiciones: ser continua, diferenciable y monóticamente no decreciente. Cualquier función que cumpla con estas características es candidata para servir de función de activación en una red *backpropagation*, sin embargo, la mayoría de los autores se han concentrado en aquellas funciones cuyas derivadas sean relativamente fáciles de calcular.

Las funciones sigmoide binaria y sigmoide tangente hiperbólica presentadas en la sección 6.1.3 cumplen con las características mencionadas y además su derivada es conocida y fácil de calcular.

Nomenclatura

x : vector de entrenamiento $x=[x_1\ x_2\ \dots\ x_i\ \dots\ x_n]$

t : vector de salidas (*target*) $t=[t_1\ t_2\ \dots\ t_i\ \dots\ t_n]$

δ_k : porción del error para la corrección de los pesos w_{jk} que se produce debido al error a la salida de la unidad Y_k .

δ_j : porción del error para la corrección de los pesos v_{ij} que se produce debido a la propagación hacia atrás de la información del error desde la capa de salida hacia las unidades de la capa oculta Z_j .

α : tasa de aprendizaje.

X_i : neuronas de la capa de entrada. La salida de la capa de entrada se llamará x_j .

v_{0j} : sesgo de la capa oculta (bias).

Z_j : neuronas de la capa oculta.

La entrada a cada neurona de la capa oculta se representa por: $z_{in j} = v_{0j} + \sum_i x_i v_{ij}$.

La salida de cada neurona de la capa oculta se representa por $z_j = f(z_{in j})$.

w_{0k} : sesgo en la unidad de salida k .

Y_k : neurona de salida k .

La entrada a la unidad Y_k se denota por: $y_{in k} = w_{0k} + \sum_j z_j w_{jk}$.

La salida de la unidad Y_k se denota por: $y_k = f(y_{in k})$.

Algoritmo de entrenamiento

Al igual que la mayoría de las ANN, la *backpropagation* funciona de manera *off-line*. Esto significa que la red solo aprenderá durante la fase de entrenamiento. Una vez finalizada la fase de entrenamiento los pesos de la red permanecerán fijos y la red cumplirá con las funciones para la cual fue entrenada.

Como ya se mencionó, el algoritmo de entrenamiento *backpropagation* involucra tres etapas: a) La propagación hacia delante de un patrón de entrenamiento, b) La propagación hacia atrás del error y c) El ajuste de los pesos.

Durante la etapa de propagación hacia delante, cada componente de un patrón de entrenamiento se presenta a su correspondiente neurona de la capa de entrada (X_i). La capa de entrada envía la información a cada neurona de la capa oculta Z_j . Cada unidad de la capa oculta computan las señales que reciben, incorporando en el cálculo el valor del sesgo (bias). La salida de cada unidad de la capa oculta es propagada hacia delante dentro de la red para servir de entradas de las unidades de la capa de salida. Cada

neurona de la capa de salida (Y_k) computa su activación (y_k) para formar la respuesta de la red a un determinado patrón de entrada.

Luego, cada neurona de salida compara su activación y_k con el correspondiente valor del vector objetivo t_k para determinar la diferencia entre la salida obtenida y la salida esperada. Basándose en esta diferencia se genera un vector δ_k el cual es empleado para distribuir el error desde la salida hacia atrás o, lo que es lo mismo, hacia todas las neuronas de las capas oculta. Este mismo vector es empleado, posteriormente, para la actualización de todos los pesos entre la capa de salida y la capa oculta w_{ij} .

De manera similar, se computa el vector δ_j para cada unidad de la capa oculta Z_j . En este punto, no es necesario propagar el error hacia la capa de entrada, pero δ_j será empleado para ajustar los pesos entre la capa oculta y la capa de entrada w_{jk} .

El algoritmo puede explicarse paso a paso de la siguiente manera:

Paso 0: Inicialización de los pesos.

Paso 1: Chequeo de condición de parada.

Paso 2: Para cada par de entrada hacer Paso 3 y Paso 4.

Inicio del proceso de propagación hacia delante

Paso 3: Cada neurona de entrada X_i ($i = 1, \dots, n$) recibe cada componente de la señal de entrada x_i y reenvía esta señal a todas las neuronas de la capa oculta.

Paso 4: Cada neurona de la capa oculta Z_j ($j = 1, \dots, p$) suma sus entradas ponderadas por los respectivos pesos

$$z_{in j} = v_{0j} + \sum_i x_i v_{ij},$$

aplica la función de activación para obtener

$$z_j = f(z_{in j})$$

y envía esta señal a todas las unidades de las capas superiores

Paso 5: Cada neurona de salida ($Y_k = 1, \dots, m$) suma sus entradas ponderadas por los respectivos pesos para obtener

$$y_{in k} = w_{0j} + \sum_j z_j w_{jk},$$

y aplica su función de activación para obtener la salida de la red

$$y_k = f(y_{in k})$$

Inicio del proceso de propagación hacia atrás (*backpropagation*)

Paso 6: Cada neurona de salida ($Y_k = 1, \dots, m$) se compara con un patrón esperado correspondiente al patrón de entrada y se computa el término de información del error dado por:

$$\delta_k = (t_k - y_k) f'(y_{in\ k})$$

luego calcula el término de corrección de los pesos

$$\Delta w_{jk} = \alpha \delta_k z_j$$

calcula el término de corrección de los bias

$$\Delta w_{0k} = \alpha \delta_k$$

y envía δ_k a las unidades de las capas inferiores.

Paso 7: Cada neurona de oculta ($Z_j, j = 1, \dots, p$) suma su información delta del error (proveniente de las capas superiores) dada por:

$$\delta_{in\ j} = \sum_{k=1}^m \delta_k w_{jk}$$

la multiplica por la derivada de su función de activación para calcular el término de información del error

$$\delta_j = \delta_{in\ j} f'(z_{in\ j})$$

calcula su término de corrección de pesos (utilizado para ajustar v_{ij})

$$\Delta v_{ij} = \alpha \delta_j x_i$$

y calcula el término de corrección del bias (utilizado posteriormente para actualizar v_{0j})

$$\Delta v_{0j} = \alpha \delta_j$$

Actualización de los pesos y los bias

Paso 8: Cada neurona de salida ($Y_k = 1, \dots, m$) actualiza los bias y los pesos ($j = 0, \dots, p$)

$$w_{jk(nuevo)} = w_{jk(viejo)} + \Delta w_{jk}$$

cada neurona de la capa oculta ($Z_j = 1, \dots, p$) actualiza su bias y pesos

($i = 0, \dots, n$)

$$v_{ij(nuevo)} = v_{ij(viejo)} + \Delta v_{ij}$$

Paso 9: Se chequea la condición de parada

La condición de parada del algoritmo usualmente se define cuando la diferencia entre la salida obtenida y la salida esperada se encuentra por debajo de un umbral establecido.

El entrenamiento de una ANN *backpropagation* no siempre converge a un valor deseado. Los algoritmos de aprendizaje pueden caer en lo que se denomina mínimos locales y el entrenamiento, sin una segunda condición de parada, podría prolongarse indefinidamente. Se dice que la etapa de aprendizaje cumple con una iteración cuando el set de entrenamiento completo es introducido en la ANN. Típicamente se necesitan varias iteraciones para finalizar con el entrenamiento de una red *backpropagation*. Además de la comparación del valor del error con un umbral definido, se establece una segunda condición de parada, la cual se emplea para terminar con el algoritmo en caso que el entrenamiento no converja. Esta condición establece un valor máximo de iteraciones que, una vez superado, hará que el entrenamiento finalice aún sin alcanzar el error esperado.

Puede observarse que la velocidad de ajuste de los pesos de la red depende del factor α denominado **tasa de aprendizaje**. La tasa de aprendizaje es un factor que determina la velocidad de convergencia del algoritmo de entrenamiento. Tasas de aprendizaje relativamente altas hacen que el algoritmo realice ajustes grandes en los pesos al final de cada iteración lo cual no garantiza que el entrenamiento converja rápidamente ya que el algoritmo podrá oscilar a medida que se acerque al valor de error esperado. Por el contrario, tasas de aprendizaje pequeñas provocarán que el algoritmo de entrenamiento se aproxime muy lentamente al error esperado.

Las bases matemáticas para el algoritmo *backpropagation* se basan en una técnica de optimización denominada **gradiente descendiente**. El gradiente es una función (en este caso la función es el error y las variables independientes son los pesos de la red) que da la dirección en la cual la función crece más rápidamente. El negativo del gradiente indica la dirección en la cual la función decrece más rápidamente.

Una vez seleccionada la red y entrenada hasta alcanzar el error mínimo, se

procede a su validación. Este procedimiento permite predecir su capacidad de generalización, entendida como la facilidad de dar salidas satisfactorias a entradas que el sistema no ha visto nunca en su fase de entrenamiento.

6.2 Consideraciones de configuración

Además de la selección de la arquitectura, la función de activación de las neuronas y las condiciones de parada del algoritmo de entrenamiento, existen ciertos parámetros que el diseñador podrá seleccionar a la hora de configurar una red.

6.2.1 Selección del valor inicial de los bias y los pesos

La elección de un valor inicial para estos parámetros tiene mucha influencia en la factibilidad y velocidad de convergencia del algoritmo de entrenamiento. Generalmente, estos valores se inicializan de manera aleatoria evitando que la selección de los mismos provoque una función de activación (o su derivada) igual a cero. Un procedimiento común es seleccionar los pesos (y bias) de manera aleatoria dentro del intervalo comprendido entre -1 y 1.

6.2.2 Selección del tamaño del set de entrenamiento

La pregunta a ser respondida en este punto es ¿Bajo qué circunstancias se puede asegurar que una red entrenada para clasificar un determinado número de patrones de entrenamiento de manera correcta también va a clasificar correctamente los patrones de pruebas obtenidos del mismo espacio muestral de donde se obtuvieron los patrones de entrenamiento?

Existe una relación entre los patrones de entrenamiento disponibles P , el número de pesos a ser entrenados W y la precisión de la clasificación esperada, e , que se resumen en la siguiente regla:

$$\frac{W}{P} = e$$

Por ejemplo, con un error de 0,1, una red con 80 pesos va a requerir 800 patrones de entrenamiento para asegurar la clasificación de 90% de los patrones de prueba, asumiendo que la red fue entrenada para clasificar correctamente el 95% de los patrones de entrenamiento.

6.2.3 Número de capas ocultas

Para Redes Neuronales con más de una capa oculta el algoritmo *backpropagation* no sufre alteraciones considerables. Si bien una única capa oculta es suficiente para aproximar cualquier mapeo continuo de un patrón de entrada a un patrón de salida, con un error arbitrario, algunas redes con más de una capa oculta pueden entrenarse más fácilmente en algunas situaciones.

6.2.4 Número de neuronas en la capa oculta

No hay una manera directa de determinar el número óptimo de neuronas en la capa oculta sin antes entrenar varias redes y estimar el error de generalización. Muy pocas neuronas en la capa oculta conducirán a un alto error de entrenamiento y un alto error de generalización provocado por el sub-entrenamiento. Por el contrario, muchas neuronas en la capa oculta podría disminuir el error de entrenamiento pero el error de generalización podría permanecer en valores no aceptables en este caso debido al sobre-entrenamiento.

Existen reglas informalmente definidas las cuales se conocen como **reglas de oro** (*rules of thumbs*) que suelen utilizarse para diseñar inicialmente una red neuronal. Estas reglas no definirán de manera exacta la mejor configuración para una red en particular. Por el contrario, la mejor arquitectura deberá ser encontrada teniendo en cuenta el problema en particular por medio de la creación de varias configuraciones y la medición del error de generalización. Algunas de estas reglas para una única capa oculta son:

La cantidad de neuronas de la capa oculta se puede calcular como las dos terceras partes del número de neuronas de la capa de entrada (Bogert y Guterman, 1997).

El número de neuronas de la capa oculta debería ser menor que el doble del número de neuronas de la capa de entrada (Berry y Linoff, 1997).

El número de neuronas de la capa oculta se debe encontrar entre el número de neuronas de la capa de entrada y el número de neuronas de la capa de salida (Blum, 1992).

6.3 Estado del arte: empleo de redes neuronales en el modelado de procesos químicos

La destilación molecular (DM) es una operación en la cual se encuentran involucrados fenómenos de transferencia de cantidad de movimiento, masa y energía, lo cual hace que su representación mediante modelos matemáticos sea muy compleja. Se suma a lo anterior el alto grado de vacío existente en esta tecnología, por lo que las predicciones de propiedades fisicoquímicas y fenomenológicas se tornan complejas e imprecisas para un modelado predictivo eficiente. Por otra parte, diversas variables pueden influir en el proceso y la interrelación multifactorial existente entre ellas ocasiona gran dificultad a la hora de controlarlas y regularlas independientemente. Pequeñas variaciones en las condiciones del proceso pueden llevar a alteraciones considerables en las características de las corrientes de salida, por lo cual deben desarrollarse modelos apropiados para optimizar las condiciones operativas (Shao y colab., 2007). El control mediante modelos predictivos es una de las estrategias más difundidas en las industrias de procesos químicos y permite que los valores que deben adoptar los parámetros controlados se obtengan del modelo. Si bien la mayoría de los algoritmos de control se fundamentan en modelos lineales, en general los procesos químicos son no lineales (Nagy, 2007).

Dentro de los modelos disponibles actualmente como alternativos al fenomenológico, las ANN se presentan como una buena opción a estudiar, dado que son herramientas predictivas para tratamientos no lineales y multirrelacionales usadas en la optimización de procesos (Rebién y colab., 1992; Magali y colab., 2003; Negro y colab., 2006).

De los diferentes modelos de ANN, la red *backpropagation* (o red de propagación inversa) es la más aplicada en la actualidad para el modelado y control de procesos químicos (Shao y colab., 2007; Nagy, 2007).

Ochoa-Estopier y colab., 2012, propusieron una nueva metodología para optimizar la integración energética de sistemas de destilación de petróleo crudo. Este nuevo procedimiento incluye una red neuronal artificial para representar la columna de destilación. La red neuronal creada fue entrenada con datos provenientes de la simulación rigurosa de la columna con el software Aspen HYSYS. Además del modelado de la columna de destilación, se introdujo un modelado para el intercambiador de calor asociado, de manera tal de determinar la configuración que mejora el rendimiento económico total.

Las salidas de la red consistieron en variables que describen la calidad del producto obtenido y también variables necesarias para determinar los requerimientos mínimos de energía del sistema integrado. El modelo de redes neuronales creado fue capaz de representar el comportamiento de la columna de destilación sin la necesidad de realizar cálculos complejos.

Vafaei y colab., 2009, utilizaron un modelo de red neuronal Perceptrón multicapa para simular la operación de destilación de petróleo crudo. La variable modelada fue la recuperación de destilado, para lo cual se utilizaron 16 conjuntos de datos obtenidos a partir de bibliografía. Se utilizaron trece conjuntos de datos para entrenar la red y los tres restantes se utilizaron para validar el modelo. La comparación entre el modelo de Perceptrón multicapa con métodos basados en ecuaciones de estado y en correlaciones de *Holland-Welch* indican que los errores de la red durante el entrenamiento y la validación fueron significativamente menores que los correspondientes a los otros métodos utilizados.

Shao y colab., 2007, crearon una red neuronal artificial con estructura *backpropagation* y además utilizaron Metodología de Superficie de Respuesta para construir un modelo predictivo que estudia el efecto combinado de variables independientes de la operación de DM sobre la recuperación de tocoferoles a partir del destilado de desodorización de aceite de colza.

6.4 Objetivo

El objetivo que se aborda en este capítulo de la tesis es predecir, mediante la aplicación de ANN, el porcentaje de destilado obtenido en la operación de DM, en función de las condiciones operativas, presión de operación y flujo de alimentación, considerando, además, cuál es la alimentación al equipo de destilación. La alimentación se caracterizó por medio de su composición.

6.5 Materiales y métodos

Debido a que el problema a resolver es de predicción, el tipo de ANN seleccionada es *feedforward* con algoritmo de entrenamiento *backpropagation*. La topología típica de la ANN *backpropagation* tiene 3 capas, una capa de entrada, una capa oculta y una capa de salida. Las conexiones entre las neuronas de una capa y otra, es a través de una matriz de pesos (w) y un vector de bias (v). La ANN fue creada, entrenada y validada mediante la utilización del programa Matlab, versión R2010a.

Debido a que la DM se realizó en 4 etapas en serie, la alimentación a cada etapa de la destilación molecular no fue la misma. En algunos casos consistió en AER y en otros casos el residuo de la etapa anterior. Se utilizaron como variables de entrada a la ANN las siguientes: flujo de alimentación, presión de operación y composición de la alimentación. La salida de la red fue: cantidad de destilado obtenido en función de la cantidad alimentada. Se utilizaron datos normalizados de flujo de alimentación y presión de operación de modo que los valores de entrada a la ANN varíen entre 0 y 1.

Los datos utilizados para crear, entrenar y validar la ANN se muestran en la Tabla 6.1. En la misma se muestran los valores de composición de la alimentación a cada etapa del DM, la presión de operación, el flujo de alimentación y el porcentaje de destilado obtenido. En la tabla se presentan resaltados en negrita los valores máximos y mínimos de composición de cada compuesto.

Debido a que la composición de alimentación de cada etapa de DM presenta muchos componentes, se muestra la relación entre los valores mínimos y máximos de

cada componente, de manera de identificar cuáles presentan las mayores variaciones como datos de entrada a la ANN. De los datos disponibles se apartó el 20% para validar la ANN con el fin de comparar con los datos experimentales y poder seleccionar la de mejor funcionamiento. Estos datos reservados para la validación de la red son los correspondientes a los ensayos 2, 6 y 13, resaltados en la tabla mediante un sombreado.

La nomenclatura utilizada al referir los compuestos y las condiciones operativas del ensayo de DM son las siguientes:

A: α -pineno

B: canfeno

C: β -pineno

D: mirceno

E: limoneno

F: 1,8-cineol

G: cimeno

H: alcanfor

I: β -linalol

J: β -cariofileno

K: *cis*-sabineno hidrato

L: α -terpineol

M: β -cariofileno epóxido

N: (6e,8e,10e)-2,6,11,15-tetrametil-2,6,8,10,14-hexadecapentaeno

PR: Presión de trabajo, normalizada

FL: Flujo de alimentación

DF: %destilado/alimentación en peso

Se evaluaron distintas alternativas de entradas de datos al momento de crear la ANN. Se comenzó por crear la red utilizando como datos de entrada las condiciones de presión y flujo, y las componentes que mostraban la mayor relación entre el valor mínimo y máximo de composición, por lo que las entradas a la red consistieron en PR, FL y los componentes A y B. Para las siguientes pruebas se fueron adicionando nuevos componentes como entradas, es decir, en la prueba siguiente se entraron, además de las

ya mencionadas, las componentes C, D, M y N, y así se fueron agregando hasta probar con la totalidad de los componentes. La salida de la red, en todos los casos, consistió en % D/F (normalizada).

La ANN fue entrenada mediante distintas alternativas:

- Reglas de aprendizaje: Se estudiaron 2 alternativas:

Trainlm: Algoritmo de entrenamiento *backpropagation Levenberg-Marquardt*

Traingdm: Algoritmo de entrenamiento *backpropagation* Gradiente descendiente con momento

- Funciones de transferencia: Se analizaron como alternativas de funciones de transferencia de la capa de entrada y de la capa oculta las siguientes:

Tansig: Función de transferencia tangente hiperbólica sigmoide. Para valores entre -1 y 1.

Logsig: Función de transferencia sigmoide binaria. Para valores entre 0 y 1.

La función de transferencia de la capa de salida fue lineal utilizando la función en Matlab: *Purelin*.

Se analizó también el número de neuronas en la capa oculta, variando el mismo entre 5, 10 y 15. El número de neuronas de la capa de entrada y de la capa de salida quedó establecido por el número de variables en cada una de ellas, siendo 1 en la capa de salida y variable en la capa de entrada de acuerdo al análisis.

El análisis para determinar cuál es la mejor ANN, se realizó por comparación de los valores de salida de la red y los valores esperados para los datos de validación. Esta comparación se cuantificó de la siguiente manera:

$$desv = \frac{yn - ye}{ye} \times 100$$

donde:

desv: es la desviación del valor esperado que muestra la red.

yn: salida de la ANN

ye: salida esperada

El programa utilizado para crear, entrenar y validar la red neuronal se muestra en el Anexo II.

Tabla 6.1: Datos de entrada a la ANN

N° ensayo	Composición de la alimentación														Condiciones operativas		
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	PR	FL	% D/F
1	0,1577	0,0531	0,0153	0,0565	0,0290	0,2924	0,0407	0,2033	0,0256	0,0260	0,0135	0,0305	0,0095	0,0172	0,145	0,596	1,000
2	0,1577	0,0531	0,0153	0,0565	0,0290	0,2924	0,0407	0,2033	0,0256	0,0260	0,0135	0,0305	0,0095	0,0172	0,398	0,702	0,454
3	0,1577	0,0531	0,0153	0,0565	0,0290	0,2924	0,0407	0,2033	0,0256	0,0260	0,0135	0,0305	0,0095	0,0172	0,639	1,000	0,327
4	0,1577	0,0531	0,0153	0,0565	0,0290	0,2924	0,0407	0,2033	0,0256	0,0260	0,0135	0,0305	0,0095	0,0172	1,000	0,213	0,022
5	0,1110	0,0387	0,0116	0,0456	0,0251	0,2624	0,0362	0,2295	0,0304	0,0288	0,0287	0,0361	0,0117	0,0196	0,663	0,106	0,000
6	0,0831	0,0299	0,0093	0,0385	0,0215	0,2321	0,0317	0,2321	0,0352	0,0349	0,0182	0,0409	0,0148	0,0252	0,289	0,106	0,123
7	0,0540	0,0200	0,0062	0,0257	0,0158	0,1811	0,0245	0,2548	0,0434	0,0470	0,0231	0,0534	0,0218	0,0332	0,000	0,000	0,345
8	0,1577	0,0531	0,0153	0,0565	0,0290	0,2924	0,0407	0,2033	0,0256	0,0260	0,0135	0,0305	0,0095	0,0172	1,000	0,277	0,276
9	0,0999	0,0364	0,0116	0,0452	0,0272	0,2714	0,0413	0,2692	0,0364	0,0366	0,0190	0,0468	0,0090	0,0143	0,458	0,083	0,263
10	0,0600	0,0230	0,0077	0,0307	0,0213	0,2174	0,0335	0,3311	0,0496	0,0518	0,0274	0,0687	0,0115	0,0189	0,187	0,034	0,165
11	0,0246	0,0099	0,0034	0,0134	0,0105	0,1262	0,0170	0,3149	0,0579	0,0858	0,0335	0,0898	0,0354	0,0667	0,054	0,089	0,187
12	0,1577	0,0531	0,0153	0,0565	0,0290	0,2924	0,0407	0,2033	0,0256	0,0260	0,0135	0,0305	0,0095	0,0172	1,000	0,106	0,262
13	0,1085	0,0387	0,0121	0,0491	0,0276	0,2707	0,0408	0,2488	0,0332	0,0346	0,0170	0,0404	0,0117	0,0227	0,458	0,023	0,313
14	0,0646	0,0246	0,0084	0,0344	0,0226	0,2239	0,0350	0,3191	0,0458	0,0503	0,0246	0,0651	0,0124	0,0238	0,187	0,109	0,145
15	0,0317	0,0124	0,0041	0,0154	0,0120	0,1375	0,0191	0,3188	0,0552	0,0868	0,0328	0,0922	0,0295	0,0608	0,054	0,077	0,030
Relación máximo - mínimo	84,416	81,429	77,863	76,188	63,970	56,841	58,770	38,578	55,726	69,991	59,817	66,898	74,562	78,537			
	Datos utilizados para validar la red creada																

6.6 Resultados y discusión

De los 15 sets de datos disponibles, 3 (correspondientes al 20%) se reservaron para la validación de la red.

En el Anexo II, se presenta la Tabla II.1 donde se muestran las redes entrenadas, en la misma se muestran las variables de entrada, la regla de aprendizaje utilizada en cada caso, y cuando la regla de aprendizaje fue *Trainngdm*, se detalla el factor de aprendizaje (*lr*). En todos los casos se muestra el mínimo error que se pretende alcanzar con el entrenamiento (*goal*), las iteraciones especificadas como máximo de cada ANN, las funciones de transferencia de la capa de entrada y la capa oculta, el número de neuronas en la capa oculta, el R^2 de la regresión entre los datos obtenidos de la ANN y los datos experimentales y el valor de desviación (*desv*) que cuantifica el error que presenta cada ANN. Los datos de *desv*, se presentan para los datos de validación.

Del análisis realizado se concluyó que la mejor red neuronal es la que utiliza como datos de entrada a las composiciones de los componentes A, B, C, D, M y N además de los datos de presión de operación (PR) y flujo de alimentación (FL). Como regla de aprendizaje se utilizó el algoritmo de entrenamiento *backpropagation Levenberg-Marquardt*. Como funciones de transferencia se utilizó para la capa de entrada la función de transferencia tangente hiperbólica sigmoide y para la capa oculta la función de transferencia sigmoide binaria. El *goal* fue de 1×10^{-4} . Las neuronas en la capa oculta fueron 10. El valor de R^2 de la regresión fue muy bueno (0,99998) y las desviaciones, al analizar los datos reservados para la validación, fueron -1,4302, -5,2238 y 6,6794.

Los resultados que dio el programa para la ANN creada, se muestran en las Figuras 6.11, 6.12 y 6.13. La Figura 6.11 muestra la estructura de la red, condiciones de entrenamiento y alcances de la misma. La Figura 6.12 muestra el avance del error producido por la ANN, y performance a lo largo del entrenamiento; en la misma se muestra que se alcanzó el valor de error requerido en 46 iteraciones, y en la Figura 6.13 se muestra la regresión lineal que arrojó el programa con los datos de entrenamiento.

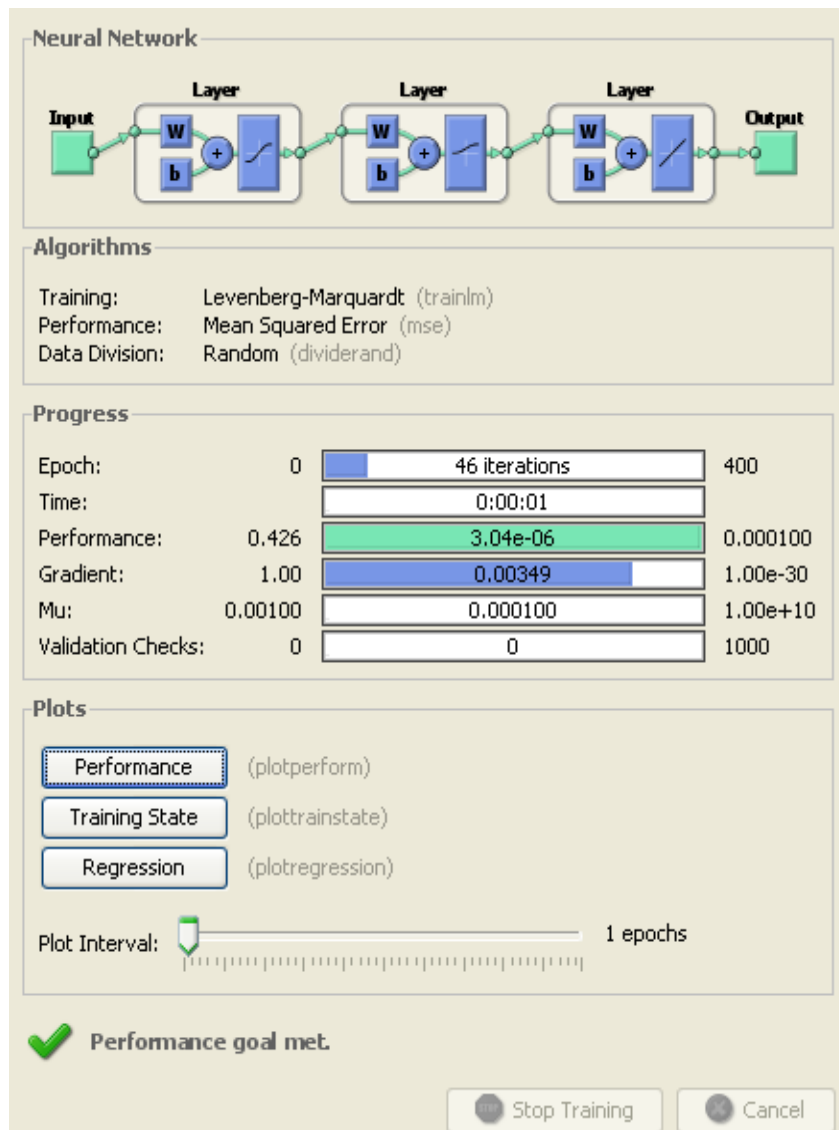


Figura 6.11: Estructura de la ANN

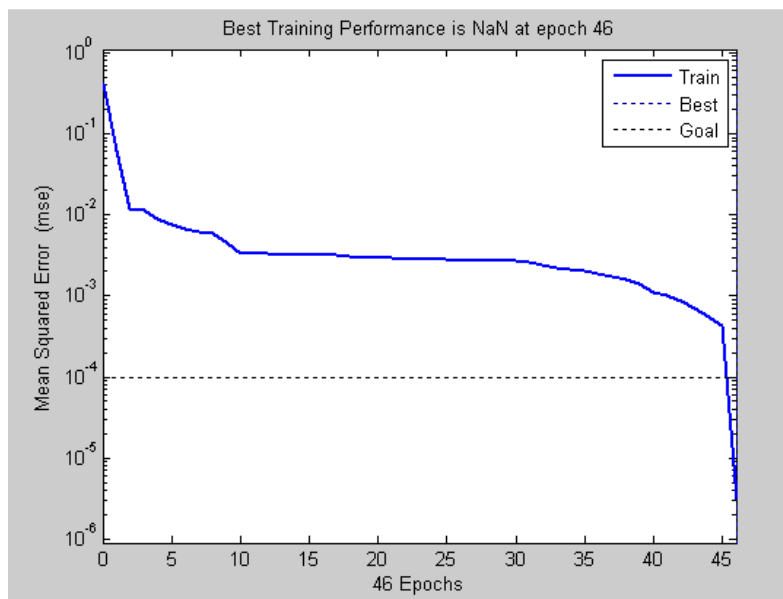


Figura 6.12: Performance de la ANN

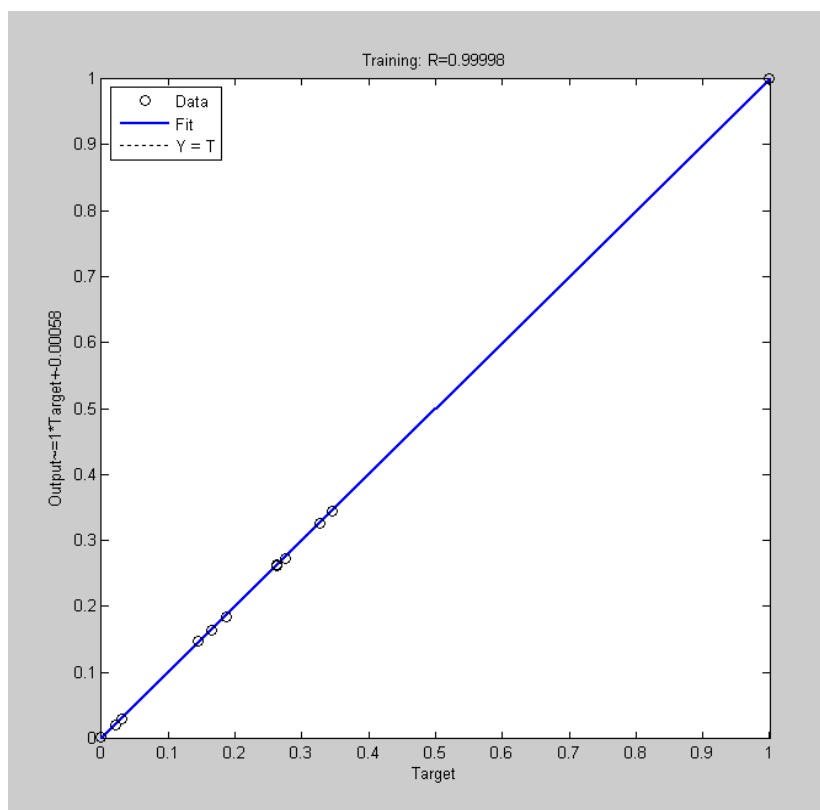


Figura 6.13: Regresión de la ANN

6.6.1 Especificaciones de la red neuronal artificial creada

- La ANN fue creada con los siguientes datos de entrada:

A: Composición de α -pineno

B: Composición de canfeno

C: Composición de β -pineno

D: Composición de mirceno

M: Composición de β -cariofileno epóxido

N: Composición de (6e,8e,10e)-2,6,11,15-tetrametil-2,6,8,10,14-hexadecapentaeno

PR: Presión de operación normalizada

FL: Flujo de alimentación normalizado

- La salida de la ANN fue:

DF: %D. Relación entre la cantidad de destilado producido en la DM y la cantidad alimentada.

Los resultados de la ANN fueron los siguientes:

- Resultado del entrenamiento:

$$y_n: \text{salida de la ANN} = \begin{bmatrix} 1,0001 \\ 0,2722 \\ 0,3266 \\ 0,0209 \\ 0,0021 \\ 0,3439 \\ 0,2635 \\ 0,1634 \\ 0,1849 \\ 0,2622 \\ 0,1467 \\ 0,0288 \end{bmatrix} \quad e: DF - y_n = \begin{bmatrix} -0,0001 \\ 0,0038 \\ 0,0003 \\ 0,0012 \\ -0,0021 \\ 0,0014 \\ -0,0006 \\ 0,0014 \\ 0,0023 \\ -0,0003 \\ -0,0020 \\ 0,0017 \end{bmatrix}$$

Como puede observarse, los resultados de error de entrenamiento de la red fueron muy bajos, del orden de 10^{-3} . Los resultados de este entrenamiento se muestran gráficamente en la Figura 6.14. En la misma se observan los datos de salida del entrenamiento de la ANN y los datos esperados.

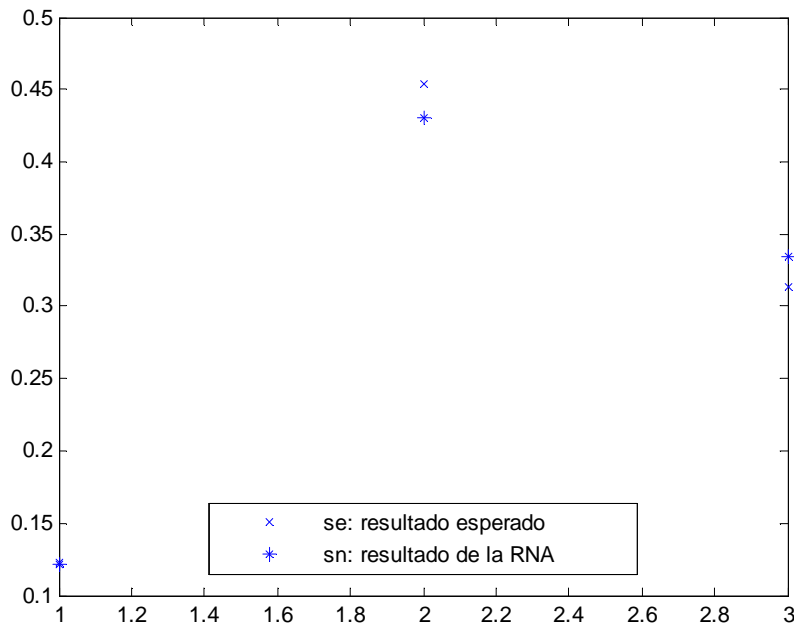


Figura 6.14: Resultados del entrenamiento de la ANN

- Resultado de la validación de la ANN

ye : Son los resultados esperados de %D, para los datos utilizados para validar la ANN.

yn : Son los resultados de salida de la ANN.

d : diferencia entre los valores de sn y se .

$desv$: desviación de los resultados de la ANN. $desv = \frac{sn-se}{se} \times 100$

$$ye = \begin{bmatrix} 0,1229 \\ 0,4541 \\ 0,3131 \end{bmatrix} yn = \begin{bmatrix} 0,1211 \\ 0,4304 \\ 0,3340 \end{bmatrix} d = \begin{bmatrix} -0,0018 \\ -0,0237 \\ 0,0209 \end{bmatrix} desv = \begin{bmatrix} -1,4302 \\ -5,2238 \\ 6,6794 \end{bmatrix}$$

Como se puede observar los resultados de desviación de la validación de la ANN (*desv*) fueron menores al 7 %. Los resultados de esta etapa de validación se muestran gráficamente en la Figura 6.15. En la misma se observan los datos de salida de la validación de la ANN y los datos esperados.

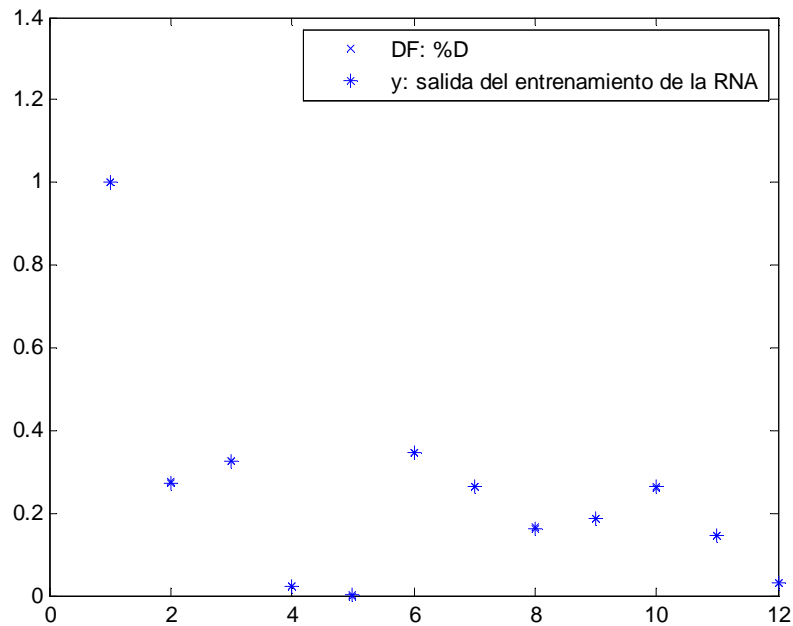


Figura 6.15: Resultados de validación de la ANN

Características de la red entrenada:

La matriz de conexión de pesos entre las neuronas de la capa de entrada y las neuronas de la capa oculta fue la siguiente:

$$w1 = \begin{bmatrix} -0.1866 & 0.2434 & -1.3238 & -0.9984 & 0.7987 & -0.1352 & 0.6813 & -0.3907 \\ 0.0160 & 0.4303 & 0.8144 & -0.4925 & -1.1882 & 0.5235 & -0.1456 & -0.7980 \\ 1.8786 & 0.1394 & -0.6670 & 0.7553 & 0.5713 & 1.4733 & -2.3627 & -0.1452 \\ -0.3757 & 0.0495 & 0.8255 & 0.6398 & -0.8189 & -1.3408 & -1.1397 & 0.0459 \\ 1.0717 & 0.3555 & 0.9505 & 1.7468 & -0.7038 & 1.3503 & 1.5957 & 2.3870 \\ -0.2343 & 0.2575 & 0.7563 & -0.8646 & 0.9235 & -0.0309 & -1.5055 & -5.2030 \\ -0.6284 & -1.3934 & -0.5200 & -1.3857 & 0.8768 & -0.1226 & 2.2441 & -3.0631 \\ 0.4925 & 0.4134 & 0.6916 & 0.5954 & 0.2531 & 0.7924 & -1.8554 & 1.2604 \\ -0.6641 & 0.3916 & 0.3754 & -0.8085 & -0.8149 & 0.1801 & -0.3438 & -1.0347 \\ 0.7101 & -0.5527 & -0.8087 & -0.0335 & -0.2599 & 0.2978 & 0.3889 & -0.2840 \end{bmatrix}$$

El vector de conexión de pesos entre las neuronas de la capa de oculta y la neurona de la capa de salida fue el siguiente:

$$w_2 = \begin{bmatrix} 0,3511 \\ 1,1749 \\ 2,8453 \\ 1,6311 \\ 1,0065 \\ 2,3862 \\ -2,4102 \\ -0,8124 \\ 0,3691 \\ 0,2228 \end{bmatrix}$$

El vector de valores bias que conecta las neuronas de la capa de entrada con las neuronas de la capa oculta fue el siguiente:

$$v_1 = \begin{bmatrix} -2,0981 \\ 1,8274 \\ -2,0956 \\ 1,0272 \\ -0,7300 \\ -1,6531 \\ 0,6688 \\ -1,3360 \\ -1,8287 \\ 2,3253 \end{bmatrix}$$

El valor bias que conecta las neuronas de la capa oculta con la neurona de la capa de salida fue el siguiente:

$$v_2 = 0,0986$$

La forma de proceder con futuros valores fue: teniendo los datos de entrada de composiciones de α -pineno, canfeno, β -pineno, mirceno, β -cariofileno epóxido, (6e,8e,10e)-2,6,11,15-tetrametil-2,6,8,10,14-hexadecapentaeno y estableciendo los valores de presión de operación normalizada y flujo de alimentación normalizado, se pudo predecir cuál será la cantidad de destilado producido en la operación de destilación molecular. Estos datos debieron ser ingresados a la ANN que cuenta con las especificaciones antes mencionadas. La forma de proceder internamente por la ANN fue la siguiente:

Salida interna de la ANN para los valores de una neurona, n_j

$$Z_j = \sum_{i=1}^q x_i * w_i + v$$

Donde:

Z_j : cualquier neurona de la capa oculta;

x_i : valor de entrada correspondiente a una neurona de la capa de entrada de la ANN;

w_i : valor de pesos correspondiente a las conexiones de esa neurona;

v : valor de bias correspondiente a las conexiones de esa neurona;

q : cantidad de neuronas de la capa de entrada

Luego la red aplica la función de transferencia especificada que transforma la salida de la ANN en la salida requerida.

6.6.2 Relación entre datos de entrada y salida

Con el afán de representar los datos de entrada y salida en una misma gráfica fue necesario realizar un agrupamiento de los datos de entrada. Esto es debido a que se necesitaron 8 variables de entrada y una de salida para poder utilizar la red y esto no es posible plasmarlo en una gráfica, ya que se necesitaría una gráfica en R^9 .

Para poder reducir tales dimensiones se utilizó una técnica de reducción del número de variables de manera que representaran la variabilidad de los datos originales. La técnica utilizada fue la de componentes principales, los cálculos de las nuevas componentes a utilizar y la representación de los mismos se realizó mediante el Software InfoStat (versión 2012, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina).

Las técnicas de reducción de dimensiones permitieron examinar todos los datos en un espacio de menor dimensión que el espacio original de las variables. En la técnica utilizada en este caso se construyeron ejes artificiales llamados componentes principales (CP).

Las componentes principales generadas en el análisis de los datos de entrada se presentan en la Tabla 6.2. En el Anexo II, se muestran los valores de autovalores y autovectores que se generaron en el análisis. Con las 2 componentes presentadas en la tabla se logró representar el 99,7% de la variabilidad de los valores originales.

En la Tabla 6.2, se presentan además los valores arrojados por la red para % D/F de los valores experimentales de % D/F (*Sal exp*).

Tabla 6.2: Ejes de componentes principales y valores experimentales esperados de %D/F (*Sal exp*)

CP 1	CP 2	Valores experimentales (<i>Sal exp</i>)
-0,126	0,447	1,0001
0,146	0,449	0,2722
0,477	0,634	0,3266
0,519	-0,230	0,0209
0,163	-0,205	0,0021
-0,185	-0,065	0,3439
-0,495	-0,055	0,2635
0,543	-0,171	0,1634
-0,035	-0,149	0,1849
-0,309	-0,094	0,2622
-0,418	0,005	0,1467
0,480	-0,329	0,0288
-0,057	-0,204	0,1211
-0,280	-0,025	0,4314
-0,421	-0,006	0,3340

En las Figura 6.16 se presenta la gráfica de los valores de % D/F experimentales (*Sal redexp*) en función de las componentes CP1 y CP2 que contienen las condiciones de entrada, se muestra, además, una gráfica de las curvas de nivel y se presentan mediante puntos los valores *Sal exp*. Se aproximó la gráfica mediante un análisis

polinomial de grado 4. Los resultados de la aproximación polinómica se presentan en la Tabla 6.3. El polinomio de grado 4 es el presentado a continuación:

$$f(CP1, CP2) = a_1 + a_2 * CP1 + a_3 * CP2 + a_4 * CP1^2 + a_5 * CP1 * CP2 + a_6 * CP1^3 + a_7 * CP1^2 * CP2 + a_8 * CP1^4 + a_9 * CP1^3 * CP2$$

El algoritmo para obtener esta gráfica se muestra en el Anexo II.

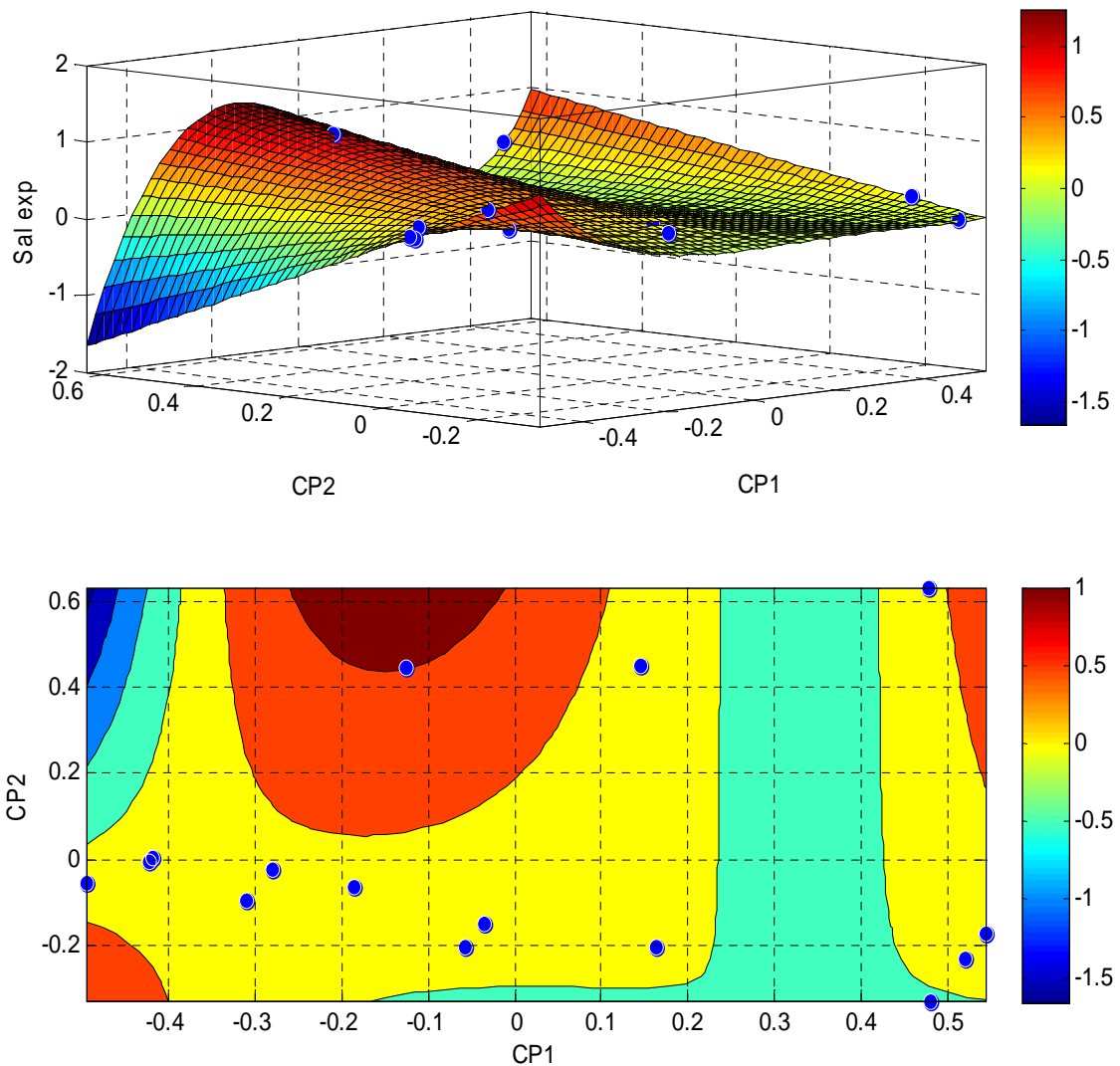


Figura 6.16: Valores de %D/F experimentales (*Sal exp*) en función de CP1 y CP2

Tabla 6.3: Coeficientes R^2 y R^2 ajustado de polinomio no lineal de aproximación con 95% de límites de confianza

Coeficientes	<i>Sal exp</i>
a_1	0,3068 (0,2205 ; 0,3931)
a_2	-1,178 (-1,639 ; -0,7178)
a_3	1,035 (0,7383 ; 1,331)
a_4	-2,026 (-4,229 ; 0,1761)
a_5	-3,905 (-5,788 ; -2,023)
a_6	5,030 (2,774 ; 7,286)
a_7	-8,866 (-17,73 ; 0,001166)
a_8	5,256 (-3,166 ; 13,68)
a_9	29,43 (10,13 ; 48,72)
R^2	0,9661
$R^2_{ajustado}$	0,9209

La red neuronal modelada brindó resultados muy buenos y que con un polinomio de grado 4 se generó una aproximación sumamente aceptable ya que el resultado del valor de $R^2_{ajustado}$ fue cercano a 1.

La disminución de variables utilizando la técnica de componentes principales fue acertada ya que sin la utilización de la misma no se podrían haber logrado evidenciar los resultados de las gráficas de la Figura 6.16.

Al comparar estos resultados con la gráfica de regresión para los resultados de la red neuronal, presentada en la Figura 6.13, los obtenidos aquí no son tan satisfactorios ya que el valor de R^2 anterior fue de 0,99998. Lo que corrobora que la red neuronal desarrollada fue sumamente satisfactoria y su performance fue más adecuada que la que provee una aproximación polinomial de orden 4.

Esta red creada y entrenada para este modelo en particular puede ser utilizada para modelar y simular procesos de similares características. En el caso de este proceso la composición de la alimentación no fue constante por lo que esta red en particular no podría utilizarse para optimizar el proceso. En caso que la condición de alimentación fuera readecuada sería posible la adaptación de la red para optimizar un proceso de estas características.

6.7 Conclusiones

Se logró predecir el comportamiento de la operación de destilación molecular mediante la aplicación de la simulación por medio de redes neuronales artificiales. El modelo implementado arrojó muy buenos resultados siendo despreciables los errores producidos en la validación de la red.

Es posible predecir valores de porcentajes de destilado producido en la operación de destilación molecular a partir de la composición de ciertos compuestos y los datos de presión de operación y flujo de alimentación.

Los resultados obtenidos demuestran que las redes neuronales artificiales pueden contribuir a la predicción del comportamiento de la destilación molecular, anticipando los valores de condiciones operativas que deberían adoptarse para asegurar una determinada cantidad de destilado producido, como un primer paso hacia el diseño de un proceso o de un sistema de control automático del proceso en tiempo real.

CAPÍTULO 7

Conclusiones finales

En el marco de esta tesis se ha podido desarrollar un equipamiento prototipo de destilación molecular construido en talleres nacionales, con la capacidad de separar compuestos de similares presiones de vapor, y de alta termolabilidad. Las eficiencias de separación obtenidas son comparables a aquellas obtenidas con equipamiento de origen alemán, y los costos de fabricación resultaron significativamente menores, sumado al hecho de poder disponer de repuestos nacionales para el mantenimiento y/o reparación del equipo cuando esto es necesario. Además, se mejoró el funcionamiento de dicho prototipo mediante la realización de diferentes pruebas posteriores al montaje del equipo y se realizaron acciones correctivas que se reflejaron en una operación más sencilla y eficiente del prototipo.

En cuanto a la producción de aceite esencial de romero se ha podido concluir que el caudal de vapor y la cantidad de romero utilizado no influyen en el rendimiento de aceite esencial producido. El rendimiento de aceite esencial producido en este caso fue de $1,53 \pm 0,17$ g aceite/ g romero seco y la composición del aceite esencial de romero obtenido responde al quimiotipo β -pineno.

Al analizar la influencia de las variables operativas de la destilación molecular se concluyó que la presión de operación y el flujo de alimentación influyen sobre la cantidad de destilado que se produce. Se observa que la presión de operación y el flujo

de alimentación tuvieron influencia en la cantidad de destilado obtenido. A medida que disminuye la presión y el flujo de alimentación, se obtuvo mayor cantidad de destilado. Y a su vez, estas condiciones operativas y el porcentaje de destilado obtenido influyen en las composiciones de las fracciones que se obtienen.

El método de capacidad de captación de radicales libres puede ser empleado para determinar la actividad antioxidante del aceite esencial de romero. Los resultados mostraron que el aceite esencial de romero tiene una considerable capacidad antioxidante.

La operación de destilación molecular es efectiva para separar y concentrar el aceite esencial de romero. Se obtuvieron fracciones (residuos) con mayor actividad antioxidante que el aceite esencial de romero. Además, hay una marcada relación entre las fracciones obtenidas por destilación molecular, los grupos de compuestos que las constituyen y su actividad antioxidante como atrapador de radicales libres. Los compuestos que se asocian a una mayor capacidad antioxidante en las fracciones analizadas son α -terpineol y *cis*-sabineno hidrato, ambos compuestos son monoterpenos oxigenados, presentes en mayor proporción en los residuos de la destilación molecular.

Por otra parte, mediante el análisis de la estabilidad oxidativa de aceite de girasol enriquecido con las fracciones obtenidas y el aceite esencial de romero, se pudo determinar que tanto las fracciones como el aceite esencial de romero poseen actividad antioxidante mejorando la estabilidad del aceite de girasol durante su almacenaje. De estas fracciones, los residuos presentaron los mejores comportamientos como antioxidantes en el aceite de girasol.

Se logró predecir el comportamiento de la operación de destilación molecular mediante la aplicación de la simulación por medio de redes neuronales artificiales, para ello se creó y entrenó una red capaz de reproducir los datos obtenidos en las operaciones de destilación molecular. Mediante la red creada es posible predecir valores de porcentajes de destilado producido en la operación de destilación molecular a partir de la composición de ciertos compuestos y los datos de presión de operación y flujo de alimentación.

Los resultados obtenidos demuestran que las redes neuronales artificiales pueden contribuir a la predicción del comportamiento de la destilación molecular, anticipando los valores de condiciones operativas que deberían adoptarse para asegurar una

determinada cantidad de destilado producido, como un primer paso hacia el diseño de un proceso o de un sistema de control automático del proceso en tiempo real.

El aceite esencial de romero posee demostrada actividad antioxidante. Sin embargo, es una mezcla compleja de compuestos con diferentes propiedades y capacidad antioxidante. El proceso de destilación molecular resulta una herramienta útil para potenciar el poder antioxidante del aceite esencial de romero, lográndose la concentración de diferentes tipos de compuestos, dando lugar a fracciones con mayor actividad y evitando el deterioro por la utilización de temperaturas y presiones reducidas. Dichas fracciones pueden ser utilizadas como aditivos de origen natural en la protección de alimentos como el aceite de girasol, susceptibles de deterioro por oxidación de los lípidos.

Nomenclatura

Símbolo		Unidades
A _C	Absorbancia de la solución de control	
AER	Aceite esencial de romero	
AERs	Aceites esenciales de romero	
AG	Aceite de girasol	
AGAER	Aceite de girasol enriquecido con aceite esencial de romero	
AGBHT	Aceite de girasol enriquecido con antioxidante comercial BHT	
AGD4	Aceite de girasol enriquecido con la fracción de destilado de la etapa 4 de las destilaciones efectuadas en serie de 4 etapas	
AGR1	Aceite de girasol enriquecido con la fracción de residuo de la etapa 1 de las destilaciones efectuadas en serie de 4 etapas	
AGR4	Aceite de girasol enriquecido con la fracción de residuo de la etapa 4 de las destilaciones efectuadas en serie de 4 etapas	
AL500	Alimentador	
A _M	Absorbancia de la solución que contiene muestra antioxidante	
API	Indicador de Presión absoluta	
ANN	Red Neuronal Artificial	
BC1	Bomba de recirculación de aceite térmico	
BDF 40	Bomba difusora	
BSA 3	Bomba rotativa	

CDD	Colector de destilado	
CDR	Colector de residuo	
%CRL	Capacidad de captación de radicales libres porcentual	
CTF 100	Calefactor por termosifón	
D	Destilado	
% D	Peso del destilado	g
% D/AER	Porcentajes de destilado en función de la cantidad de AER alimentado en la primera etapa de la experiencia	
DC	Índice de dienos conjugados	
DCC4	Destilador de camino corto	
<i>desv</i>	Desviación del valor esperado que muestra la red	
% D/F	Porcentajes de destilado obtenido en función de la cantidad alimentada en cada etapa	
DM	Destilación molecular	
EC ₅₀	cantidad de muestra que disminuye la concentración de DPPH* inicial al 50 %	mg/ml ; µl/ml
F	Alimentación	
FR	Flujo de alimentación	ml/min
FID	Detector de ionización de llama	
HCV	Válvula de alimentación	
H8	Trompa de vacío	
IC	Índice de concentración del componente	
IP	Índice de peróxidos	
IP _{i,j,k}	Respuesta al análisis de varianza para el IP	
N	Normalidad de la solución de tiosulfato de sodio	
m	masa de la muestra utilizada	
MV	Válvula micrométrica	
OR	Oleoresina de romero	
P	Presión de operación	bar
<i>q</i>	Cantidad de neuronas de la capa de entrada	
R	Residuo	
% R	Peso del residuo	g
R ²	Coefficiente de la regresión	
% R/AER	Porcentajes de residuo en función de la cantidad de AER alimentado en la primera etapa de la experiencia	
% R/F	Porcentajes de residuo obtenido en función de la	

	cantidad alimentada en cada etapa	
S	Volumen de solución de tiosulfato de sodio utilizado en la titulación	ml
T	Temperatura	°C
TC	Índice de trienos conjugados	
UA	unidades de absorbancia	
v	valor de bias correspondiente a las conexiones de la neurona x_i	
v_{ij}	sesgo de la capa de salida (bias)	
v_{0j}	sesgo de la capa oculta (bias).	
VPFT	Calefactor de aceite térmico	
w	peso de la corriente j	g
w_i	Valor de pesos correspondiente a las conexiones de la neurona x_i	
w_{jk}	Pesos de las neuronas de la salida	
x	composición	% p/p
X_i	Neuronas de la capa de entrada	
x_i	Valor de entrada correspondiente a una neurona de la capa de entrada de la ANN	
x_j	salida de la capa de entrada	
y_e	salida esperada	
$y_{in k}$	La entrada a la unidad Y_k	
y_k	La salida de la unidad Y_k	
Y_k	Neurona de salida k	
yn	salida de la ANN	
$z_{in j}$	Entrada a cada neurona de la capa oculta	
z_j	Salida de cada neurona de la capa oculta	
Z_j	neuronas de la capa oculta	

Letras griegas**Unidades**

α	Tasa de aprendizaje.
α_i	Efecto del tiempo sobre la respuesta
β	Coefficientes de la regresión
δ_φ	Porción del error salida hacia las unidades de la capa oculta Z_j .
δ_κ	Porción del error para la salida de la unidad Y_k

$\varepsilon_{i,j}$	Efecto de la interacción tiempo*tratamiento (error experimental)	
$\gamma_{i,j,k}$	Error de muestreo	
η	Rendimiento porcentual de operación de hidrodestilación de romero	$\frac{g_{aceite}}{g_{romero \text{ base seca}}}$
η	Rendimiento porcentual de la operación de DM	
μ	Media general	
τ_j	Efecto de cada uno de los tratamientos (muestras analizadas)	

Subíndices

- A En la alimentación
 i del componentes identificados
 j de la corriente destilado (D), residuo (R)

Referencias

Alexandrov, K.; Rojas, M y Rolando, C. (2006). “DNA damage by benzo (a) pyrene in human cells is increased by cigarette smoke and decreased by a filter containing rosemary extract which lowers free radicals”. *Cancer Research*, 66, 24 11517-12052.

AOAC. 1995. Official methods of analysis. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC, USA.

Asociación Argentina de Girasol (ASAGIR) http://www.asagir.org.ar/cap_4.asp

Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. (2008). “Biological Effects of essential oils – A review”. *Food and Chemical toxicology*, 46, 446-475.

Barreto, H. M.; Silva Filho, E. C.; Lima, E. O.; Coutinho, H. D. M.; Morais-Braga, M. F. B.; Tavares, C. C. A.; Tintino, S. R.; Rego, J. V.; Abreu A. P. L.; Gomes Lustosa, M. C.; Guimarães Oliveira, R. W.; Citó, A. M. G. L. y Dantas Lopes, J. A. (2014). “Chemical composition and possible use as adjuvant of the antibiotic therapy of the essential oil of *Rosmarinus officinalis L.*” *Industrial Crops and Products*, 59, 290–294.

Belcuore, H. (2007). “Evaluación de la oxidación lipídica en alimentos”. *Aceites y grasas*, 66.

Beretta, G.; Artali, R.; Maffei Facino, R. y Gelmini, F. (2011). “An analytical and theoretical approach for the profiling of the antioxidant activity of essential oils: The case of *Rosmarinus officinalis L.*”. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55, 1255-1264.

- Berry, M. J. A. y Linoff, G. (1997). *“Data Mining Techniques: For Marketing, Sales, and Customer Support”*. John Wiley & Sons, Inc. New York, NY, USA.
- Berzins, M. L y Romagnoli S. (2005). Cultivo de plantas aromáticas. Fruticultura y diversificación, 11, 47
- Bishop, C. M. (1995). *“Neural networks for pattern recognition”*. Clarendon press, Oxford, UK.
- Blum, A. (1992). *“Neural Networks in C++: an object-oriented framework for building connectionist systems”*. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA.
- Boger, Z. y Guterman, H. (1997). *“Knowledge extraction from artificial neural network models”*. IEEE conference publications, 4, 3030 - 3035.
- Borgarello, A. V.; Mezza, G. N.; Soltermann, A. T. Y Pramparo M. C. (2014). *“Use of a free radical scavenging method on extracts obtained by molecular distillation from oregano essential oil”*. Latin American Applied Research, 44, 1.
- Bourre J. M., Francois M., Youyou A., Dumont O., Piciotti M., Pascal G., y Durand G. (1989). *“The effects of dietary alpha- linoleic acid on the composition of nerve membranes, enzymatic activity, amplitude of electrophysiological parameters, resistance to poisons and performance of learning tasks in rats”*. Journal of Nutrition 119: 1880-1892.
- Bousbia, N.; AbertVian, M.; Ferhat, M. A.; Petitcolas, E.; Meklati, B. Y. y Chemat, F. (2009). *“Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity”*. Food Chemistry, 114, 355-362.
- Boutekdjiret, C.; Bentahar, F. y Belabbes, R.; (1998). *“The essential oil from Rosmarinus officinalis L. in Algeria.”*J. Essent. Oil Res., 10, 680-682.
- Bozin, B.; Mimica-Dukic, N.; Samojlik, I. y Jovin, E. (2007). *“Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (Rosmarinus officinalis L. and Salvia Officinalis L., Lamiaceae) essential oils”*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 78789-7885.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E. y Berset, C. (1995). *“Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity”*. Lebensmittel-wissenschaft and Technology. 28, 25-30.

Cerpa Chávez, M. G. (2007). Tesis Doctoral: “Hidrodestilación de aceites esenciales: Modelado y caracterización”. Universidad de Valladolid, España.

Código Alimentario Argentino (CAA) (2001). Ley 18284. Capítulo XI: Alimentos Vegetales y Capítulo VII: Alimentos Grasos. Ministerio de Salud y Acción Social. Argentina.

COI. 2001. Método de análisis, prueba espectrofotométrica en el ultravioleta. Document COI/T, 20/Doc. no. 19/Rev. 1. Internacional Olive Oil Council (IOOC), Madrid, España.

Debersac, P.; Heydel, J. M.; Amiot, M. J.; Goudonnet, H.; Artur, Y.; Suschetet, M. y Siess, M. H. (2001). “*Induction of cytochrome P450 and/or detoxication enzymes by various extracts of rosemary: description of specific patterns*”. *Food and Chemical Toxicology*, 39, 907-918.

Elamrani, A.; Zrira, S. y Benjlali, B. (2000). “*A study of Moroccan Rosemary Oils*”. *J. Essent. Oil Res.*, 12, 487-495.

FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) (<http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/search.html?lang=en>)

Faixová, Z. y Faix, S. (2008). “*Biological effects of Rosemary (Rosmarinus officinalis L.) essential oil*”. *Folia Veterinaria*, 52, 3-4: 135-139.

Fausett, L. (2006). “*Fundamentals of Neural Networks: Architectures, Algorithms, and Applications*”. Prentice-Hall, Inc. Upper Saddle River, NJ, USA.

Flamini, G.; Cioni, P. L.; Morelli, I.; Macchia, M. y Ceccarini, L. (2002) “*Main agronomic-productive characteristics of two ecotypes of Rosmarinus officinalis L. and chemical composition of their essential oils*”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3512-3517.

Fregolente, L. V.; Fregolente P. B. L.; Chicuta, A. M.; Batistella, C. B.; Maciel, R. y Wolf-Maciel, M. R. (2007). “*Effect of operating of monoglycerides using molecular distillation*.” *IChemE*, 85, (A11) 1524-1528.

Gillij, Y.G.; Gleiser, R.M. y Zygodlo, J.A. (2008). “*Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina*.” *Bioresource Technology*, 99, 2507–2515.

Guala, M. S.; Elder, H. V.; Perez, G. y Chiesa, A. (2009). Evaluación del poder antioxidante de fracciones de aceite esencial crudo de *Schinus molle* L. obtenidas por destilación al vacío. *Información tecnológica*, 20(2) 83-88.

Hertz J.; Krogh A. y Palmer R.G. (1993). “*Introduction to the theory of neural computation (vol.1, 7th edition)*. Santa Fe institute”. Ed. Addison & Wesley, Redwood City CA, USA.

Hilera, J. R. y Martinez, V. J. (1995). *Redes Neuronales Artificiales*. Ed. Ra-Ma, Addison –Wesley Iberoamericana, Delaware, USA.

Hosni, K.; Hassen, I.; Chaâbane, H.; Jemli, M.; Dallali, S.; Sebei, H. y Casabianca, H. (2013). “*Enzyme-assisted extraction of essential oils from thyme (Thymus capitatus L.) and rosemary (Rosmarinus officinalis L.): Impact on yield, chemical composition and antimicrobial activity*”. *Industrial Crops and Products*, 47, 291– 299.

Hui Y. H. (1996). *Bailey’s Industrial Oil and Fat Products*. Hui Y. H. and John Wiley, New York, USA.

Ibañez, E.; Oca, A.; Murga, G.; López-Sebastián, S.; Tabera, J. y Reglero, G. (1999). “*Supercritical Fluid Extraction and Fractionation of Different Preprocessed Rosemary Plants*”. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1400-1404.

Ibañez, E.; Kubátová, A.; Señoráns, J.; Cavero, S.; Reglero, G. y Hawthorne, S. (2003). “*Subcritical Water Extraction of Antioxidant Compounds from Rosemary Plants*”. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 375-382.

InfoStat (2009). InfoStat versión 2009. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

INTA. 2009. Documento base del programa nacional de oleaginosas. Publicado en Internet, disponible en <http://inta.gob.ar/documentos/documento-base-del-programa-nacional-oleaginosas/>. Activo septiembre 2012.

Jordán, M. A.; Lax, V.; Rota, M. C.; Lorán, S. y Sotomayor, J. A. (2013). “*Effect of bioclimatic area on the essential oil composition and antibacterial activity of Rosmarinus officinalis L.*” *Food Control*, 30, 463-468.

Kadri, A.; Zarai, Z.; Ben Chobba, I.; Békir, A.; Gharsallah, N.; Damak, M. y Gdoura, R. (2011). “*Chemical constituents and antioxidant properties of Rosmarinus*

officinalis L. essential oil cultivated from south-western Tunisia”. *Journal of Medical Plants research*, 5, (25) 5999-6004.

Lercker, G. y Rodriguez-Estrada, M. T. (2002). *Cholesterol oxidation mechanism*. F. Guardiola; P.C. Dutta; R. Codony; G.P. Savage (Eds.), “*Cholesterol and phytosterol oxidation products: Analysis, occurrence and biological effects*”, AOCS Press, Champaign, IL, 1-26.

Magali, R.; Meireles, G.; Paulo P.; Almeida, M. y Simoes, M. G. (2003). “A comprehensive review for industrial aplicability of artificial neural networks”. *IEEE. Transactions on Industrial Electronics*, 50, 585-601.

Martins, P. F.; Carmona, C.; Martines, E. L.; Sbaite, P.; Maciel Filho, R. y Wolf Maciel, M. R. (2012). “Short path evaporation for methyl chavicol enrichment from basil essential oil.” *Separation and Purification Technology*, 87, 71-78.

Martínez, M.; Penci, M.; Ixtaina, V.; Ribotta, P. y Maestri, D. (2013). “Effect of natural and synthetic atioxidants on the oxidative stability of walnut oil under different storage conditions”. *Food Science and Technology*, 51, 44-50.

Miró Erdmann, S. (2011). “Desarrollo de un modelo matemático para el proceso de separación por destilación molecular de mezclas oleosas”. Tesis de Maestría en Ciencias de la Ingeniería. Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Río Cuarto. Río Cuarto.

Nagy, Z. K. (2007). “Model based control of a yeast fermentation bioreactor using optimally designed artificial neural networks”. *Chemical Engineering Journal*, 127, 95-109.

Negro, C.; Alonso, A.; Blanco, A. y Tijero, J. (2006). “Optimization of fiber cements composite process”. *Industrial and Engineering chemistry research*, 45, 197-2005.

Nieto, G.; Díaz, P.; Bañón S. y Garrido, M. D. (2010). “Dietary administration of ewe diets with a distillate from rosemary leaves (*Rosmarinus officinalis*L.): influence on lamb meat quality”. *Meat Science*, 84, 23-29.

Nieto, G.; Jongberg, S.; Andersen, M. L. y Skibsted, L. H. (2013). “Thiol oxidation and protein cross-link formation during chill storage of pork patties added essential oil of oregano, rosemary, or garlic”. *Meat Science*, 95, 177–184.

Ochoa-Estopier, L. M.; Jobson, M. y Smith, R. (2012). “Operational optimization of crude oil distillation systems using artificial neural networks”. *Computers and Chemical Engineering*, 59, 178-185.

Ojeda-Sana, A. M.; Van Baren, C. M.; Elechosa, M. A. y Juárez, M. A. (2013) “New insights into bacterial and antioxidant activities of Rosemary essential oils and their components”. *Food Control*, 31, 189-195

Okoh, O. O.; Sadimenko, A. P. y Afolayan, A. J. (2010). “Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods”. *Food Chemistry*, 120, 308–312.

Olmedo, R. H.; Nepote, V.; Mestrallet M. G. y Grosso N. R. (2008). “Effect of the essential oil addition on the oxidative stability of fried-salted peanuts”. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 1935-1944.

Olmedo, R.; Nepote, V. y Grosso, N. (2013). “Preservation of sensory and chemical properties in flavoured cheese prepared with cream cheese base using oregano and Rosemary essential oils”. *Food Science and Technology*, 53, 409-417.

Osawa, C. C. y Gonçalves, L. A. G. (2006). “Oxidación lipídica y nuevos métodos analíticos de detección”. *Aceites y grasas*, 63, 330.

Özcan, M. y Arslan, D. (2011). “Antioxidant effect of essential oils of rosemary, clove and cinnamon on hazelnut and poppy oils”. *Food Chemistry*, 129, 171-174.

Peroni, C.V. (2002). “Optimization and Control of fed-batch fermentation processes by using artificial neural systems”. Tesis (Ph. D. en Ingeniería Química). Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, España.

Peter, K. V. (2001). *Handbook of Herbs and Spices*, Volumen 1, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK.

Peter, K. V. (2004). *Handbook of Herbs and Spices*, Volumen 2, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK.

Pokorny, J.; Yanishlieva, N. y Gordon, M. (2001) “Antioxidants in food: practical applications”. *Wood head Publishing*, Cambridge.

Pramparo, M.; Prizzon, S. y Martinello, M. A. (2005). “Estudio de la composición de ácidos grasos, tocoferoles y esteroides a partir del destilado de desodorización”.

Grasas y aceites, 56, (3) 228-234.

Pramparo, M., Leone, I., Martinello, M. A. (2008). "Simulation of deacidification process by molecular distillation of deodorizer distillate". *Latin American Applied Research*, 38, 299-304.

Quantrille, T. E. y Liu Y. (1991). "Artificial Intelligence in Chemical Engineering". Ed. Academic press, San Diego, USA.

Randall, M. J.; Winfield, A. F. T. y Pipe, A. G. (2000). "Stable on-line neural control of systems with closed kinematic chains". *IEEE Proc. Control Theory Applications*, 147, 619-632.

Rebién, D. A.; Maze, S. M. y Havener J. P. (1992). "The application of neural network in the process industry". *ISA Transation*, 31, 7-13.

Rezzoug, S. A.; Boutekedjiret, C. y Allaf, K. (2005). "Optimization of operating conditions of rosemary essential oil extraction by a fast controlled pressure drop process using response surface methodology". *Journal of Food Engineering*, 71, 9-17.

Rodríguez Álvarez, M.; Alcaraz Meléndez, L. y Real Cosío, S. M. (2012). "Procedimientos para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas." Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C México.

Rodriguez-Rojo, Visentin, A.; Maestri, D. y Cocero, M. J. (2012). "Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents". *Journal of Food Engineering*, 109, 98-103

Romero Márquez, M. D. (2004) "Plantas aromáticas: Tratado de aromaterapia científica". Kier, Buenos Aires, Argentina.

Rossi, P.; Willnecker, A. A.; Berti, J.; Borgarello, A. V.; Mezza, G. N. y Pramparo, M. C. (2011). "d-limonene and geranial fractionation from lemon essential oil by molecular distillation". *Latin American Applied Research*, 4, 81-85.

Santana-Méridas, O.; Polissiou, M.; Izquierdo-Melero, M.E.; Astraka, K.; Tarantilis, P. A.; Herraiz-Peñalver, D. y Sánchez-Vioque R. (2014). "Polyphenol composition, antioxidant and bioplaguicide activities of the solid residue from hydrodistillation of *Rosmarinus officinalis L.*" *Industrial Crops and Products*, 59, 125-134.

Sacchetti, G.; Maietti, S.; Muzzoli, M.; Scaglianti, M.; Manfredini, S.; Radice M. y Bruni, R. (2005). “Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antirradicals and antimicrobial in foods”. *Food Chemistry*, 91 621-632.

Sawamura, M. (2010). “*Citrus Essential Oils: Flavor and Fragrance*”, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

Singh, G.; Kapoor, I.; Singh, P.; Heluani, C. y Lampasona, M. (2008). “Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*”. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 3295-3302.

Singh, M. y Guleria, N. (2013). “Influence of harvesting stage and inorganic and organic fertilizers on yield and oil composition of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in a semi-arid tropical climate”. *Industrial Crops and Products*, 42, 37– 40.

Shao, P.; Jiang, S. T. y Ying, Y. J. (2007). “Optimization of molecular distillation for recovery of tocopherol from rapeseed oil deodorizer distillate using response surface and artificial neural network models”. *Food and Bioproducts Processing*, 85, 85-92.

Socaci, S. A.; Tofana, M.; Socaciu, C.; Varban, D.; Muste, S. (2007) “Comparative study of diferent Rosemary essential oil”. *Bulletin USAMV-CN*, 63.

Soltani, M.; Ghodrathnama, M.; Ebrahimzadeh-Mosavi, H. A.; Nikbakht-Brujeni, G.; Mohamadian, S. y Ghasemian, M. (2014). “Shirazi thyme (*Zataria multiflora* Boiss) and Rosemary (*Rosmarinu officinalis*) essential oils repress expression of *sagA*, a streptolysin S-related gene in *Streptococcus iniae*”. *Aquaculture*, 430, 248–252.

Szumny, A.; Figiel, A.; Gutiérrez-Ortíz, A. y Carbonell-Barrachina, A. (2010) “Composition of rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis*) as affected by drying method”. *Journal of Food Engineering*, 97, 253-260.

Tsimidou, M.; Papavergou, E. yBoskou, D. (1995). “Evaluation of oregano antioxidant activity in mackerel oil”. *Food Research International*, 28, 4, 431-433.

Usai M.; Marchetti M.; Foddai M.; Del Caro, A.; Desogus, R.; Sanna, I. y Piga, A. (2011). “Influence of different stabilizing operations and storage time on the composition of essential oil of thyme (*Thymus officinalis* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.)”. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 244-249.

Vafaei, M. T.; Eslamloueyan, R. y Ayatollahi, Sh. (2009). “*Simulation of steam distillation process using neural networks*”. *Chemical Engineering Research and Design*, 87, 997-1002.

Varela, F.; Navarrete, P.; Cristobal, R.; Fanlo, M.; Melero, R.; Sotomayor, J. A.; Jordan, M. J.; Cabot, P.; Sánchez de Ron, D.; Calvo, R. y Cases, A. (2009). “*Variability in the chemical composition of wild Rosmarinus officinalis L.*”. *Acta Horticulturae*, 826, 167-174.

Visentin, A.; Cismondi, M. y Maestri, D. (2011). “*Supercritical CO2 fractionation of rosemary ethanolic oleoresins as a method to improve carnosic acid recovery*”. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12, 142–145.

Yosr, Z.; Hnia, C.; Rim, T. y Moha, M. (2013). “*Changes in essential oil composition and phenolic fraction in Rosmarinus officinalis L. var. typicus Batt. organs during growth and incidence on the antioxidant activity*”. *Industrial Crops and Products*, 43, 412– 419.

Wang, W.; Wu, N.; Zu, Y. G. y Fu, Y. J. (2008). “*Antioxidative activity of Rosmarinus officinalis L. essential oil compared to its main components*”. *Food Chemistry*, 108, 1019–1022.

World Health Organization (2007) “*Prevention of Cardiovascular Disease*”. *Guidelines for assessment and management of cardiovascular risk*. Geneva. http://whqlibdoc.who.int/publications/2007/9789241547178_eng.pdf.

Anexo I

A continuación se presentan las concentraciones, rendimientos porcentuales e índices de concentración de los componentes más y menos volátiles en los destilados y en los residuos de las fracciones obtenidas por destilación molecular en serie de cuatro etapas detalladas en el capítulo 4.

Gráficas de concentraciones de los compuestos más y menos volátiles en los destilados.

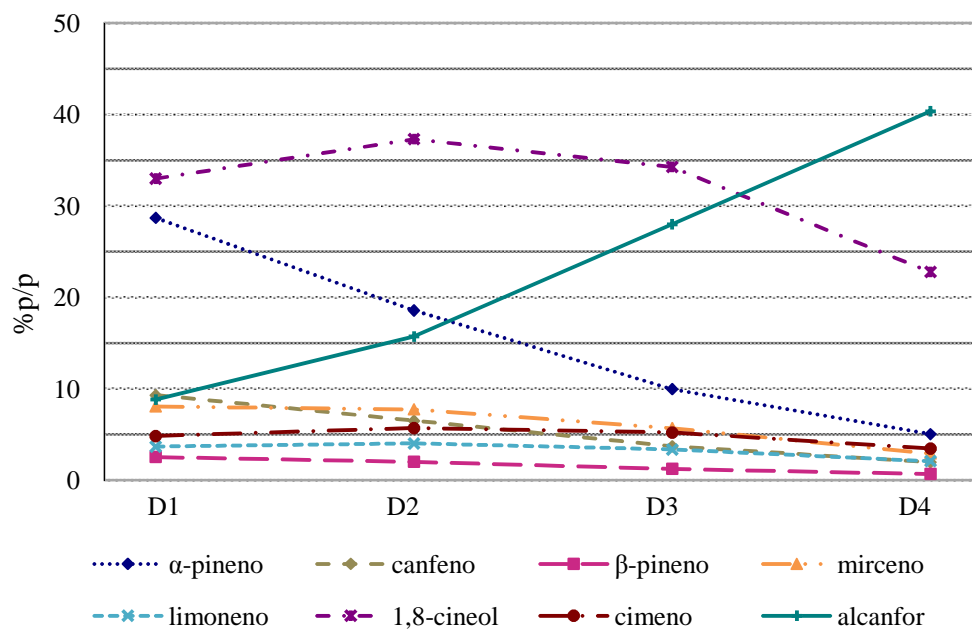


Figura I.1: Composición (%p/p) de los compuestos más volátiles en los destilados.

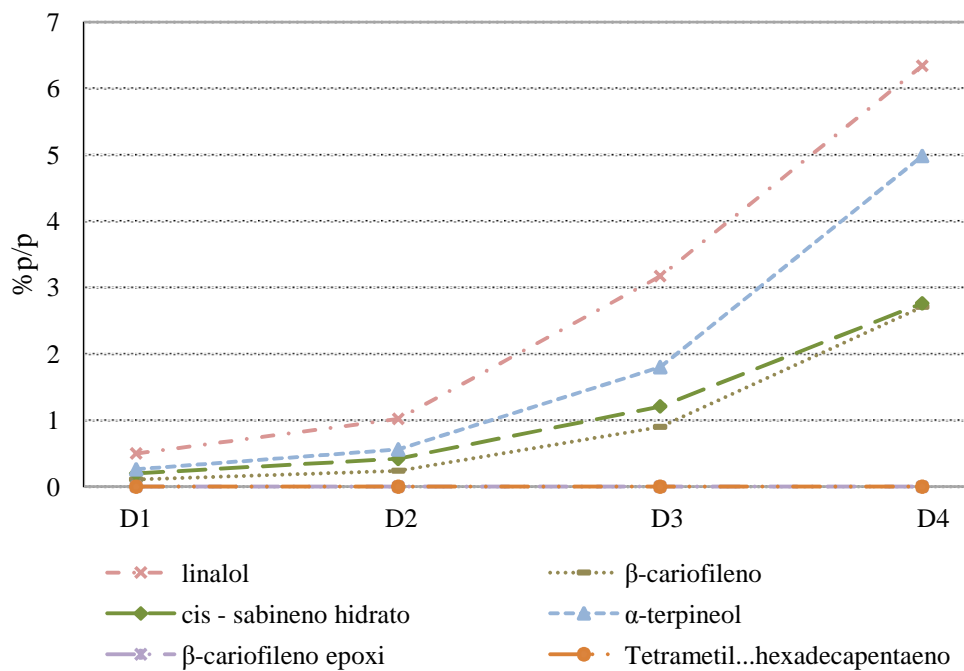


Figura I.2: Composición (%p/p) de los compuestos menos volátiles en los destilados.

Gráficas de rendimientos porcentuales de los compuestos más y menos volátiles en los destilados.

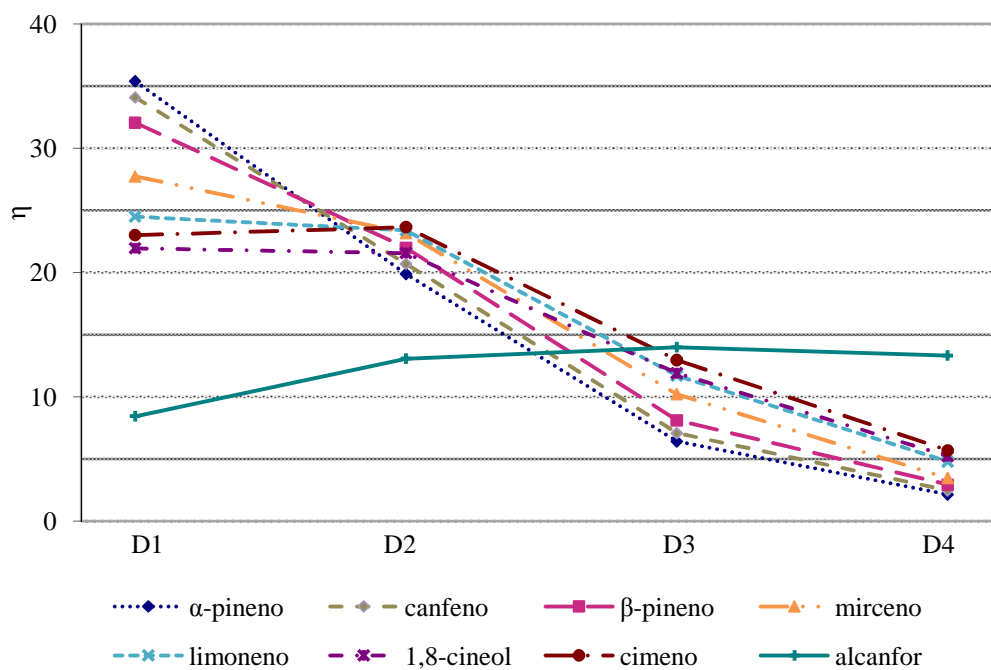


Figura I.3: Rendimiento porcentual (η) de los compuestos más volátiles en los destilados.

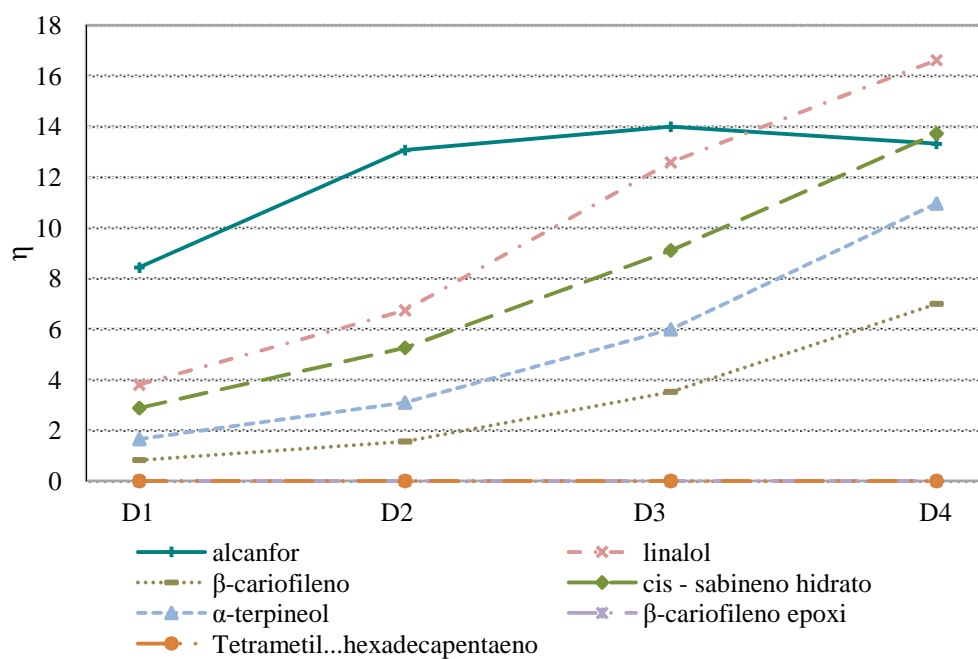


Figura I.4: Rendimiento porcentual (η) los compuestos menos volátiles en los destilados.

Gráficas de índices de concentración de los compuestos más y menos volátiles en los destilados.

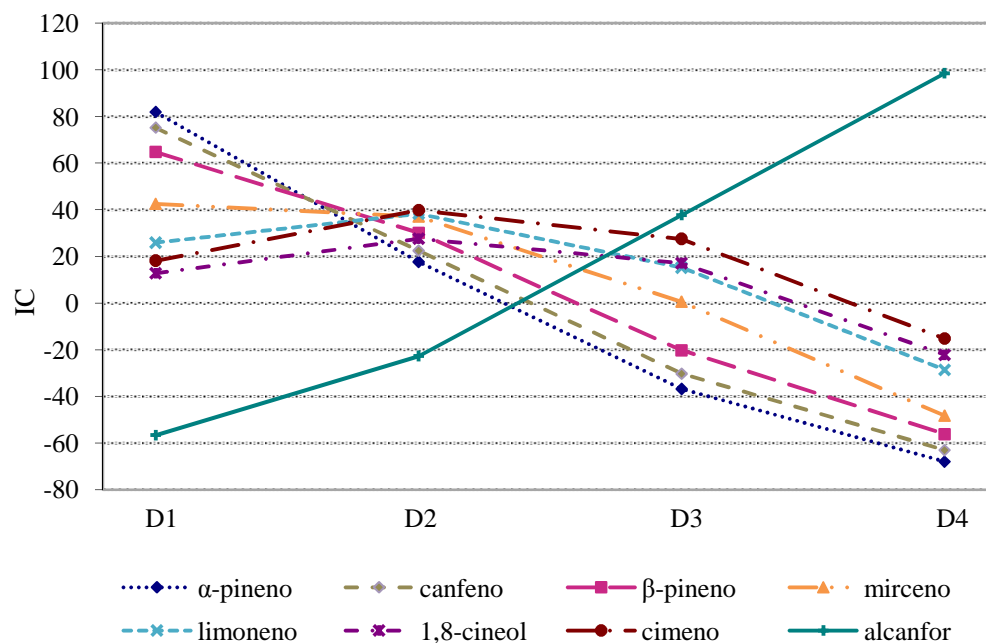


Figura I.5: Índices de concentración (IC) de los compuestos más volátiles en los destilados.

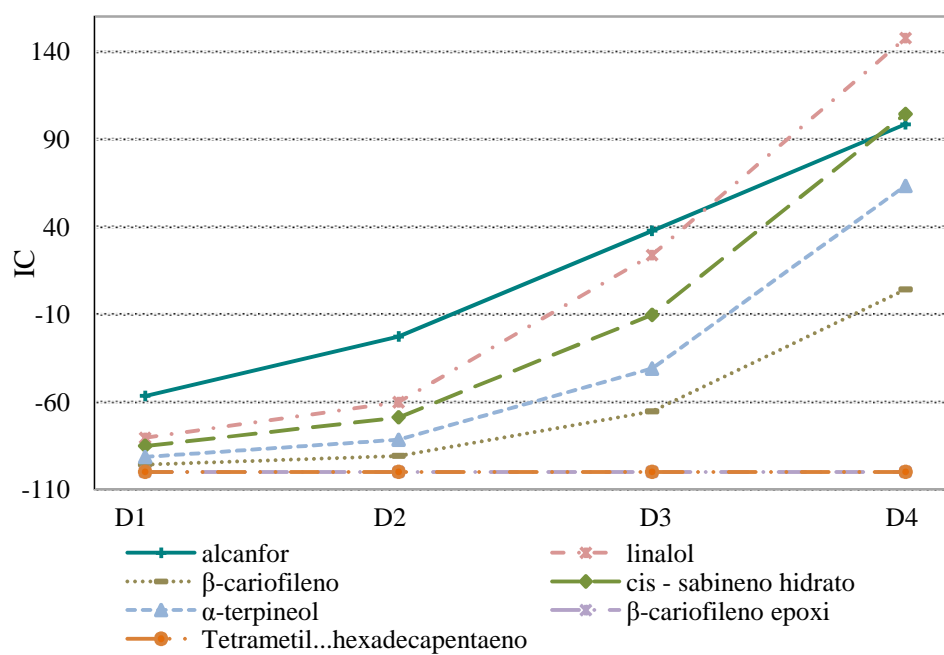


Figura I.6: Índices de concentración (IC) de los compuestos menos volátiles en los destilados.

Gráficas de concentraciones de los compuestos más y menos volátiles en los residuos.

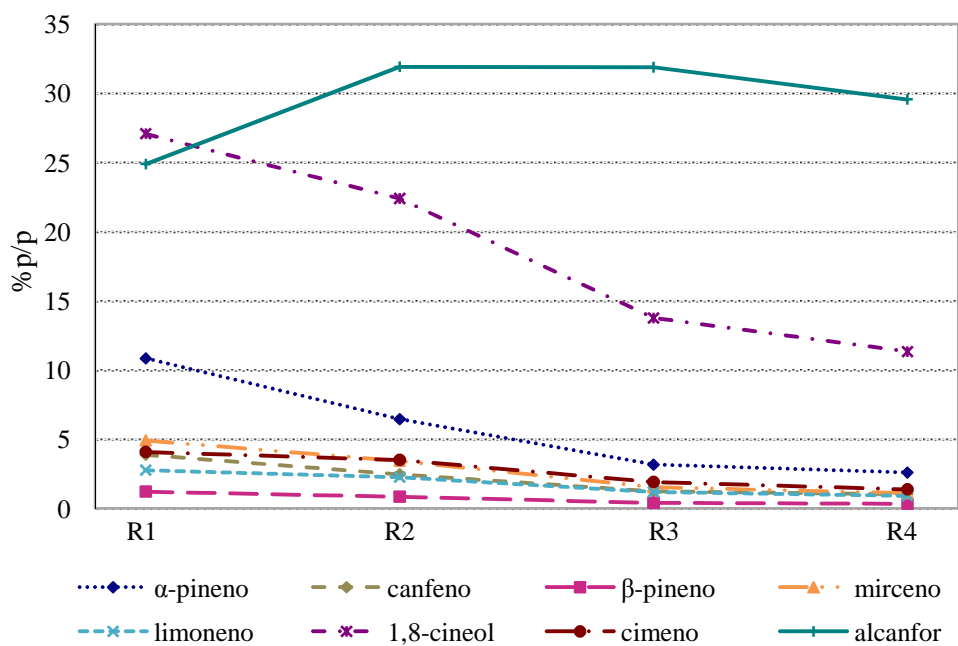


Figura I.7: Composición (%p/p) de los compuestos más volátiles en los residuos.

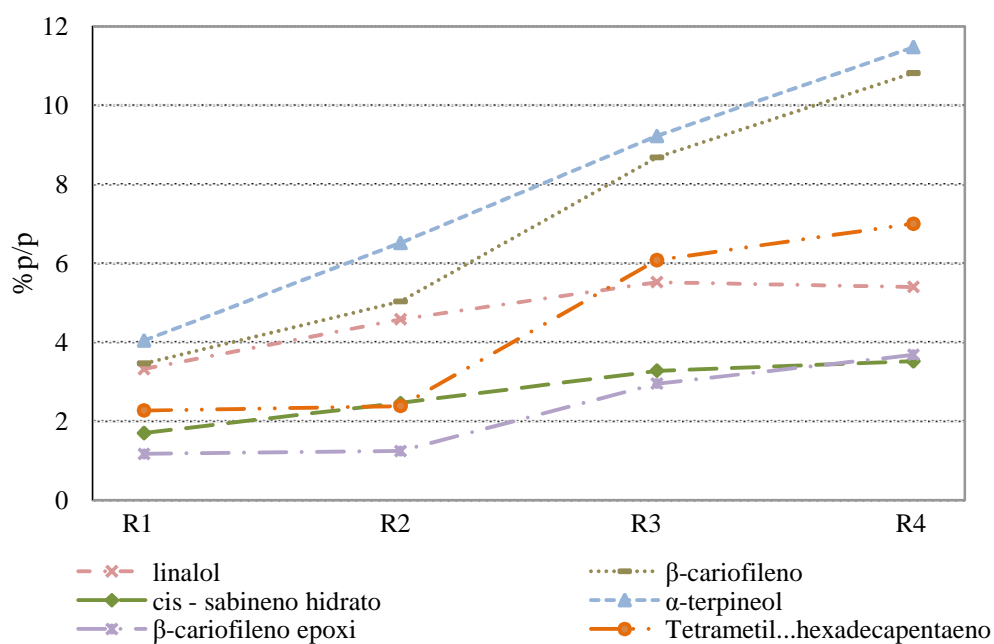
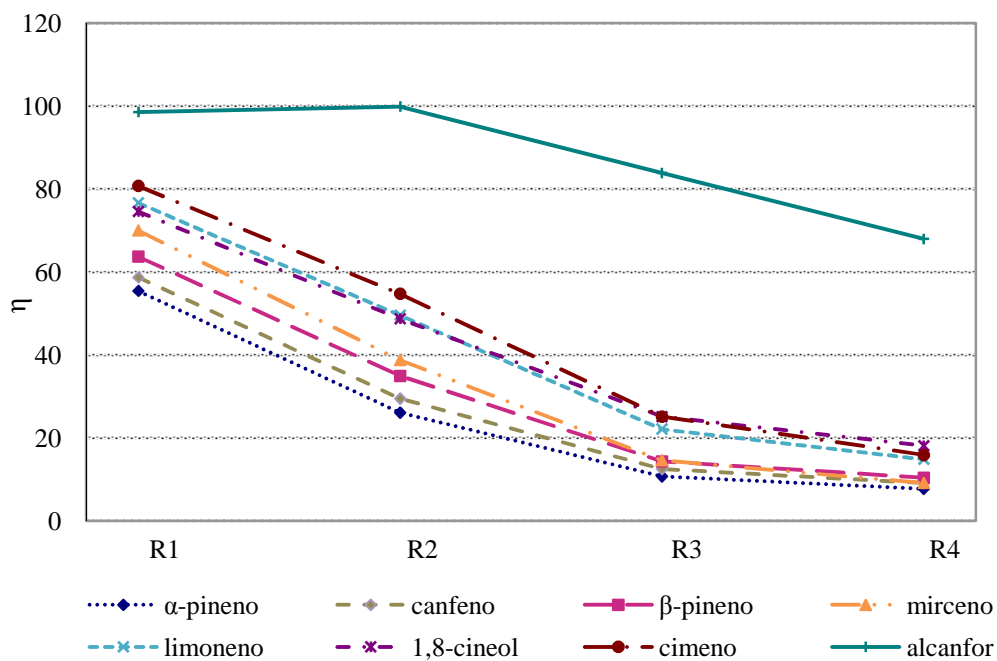


Figura I.8: Composición (%p/p) de los compuestos menos volátiles en los residuos.

Gráficas de rendimientos porcentuales de los compuestos más y menos volátiles en los residuos.

**Figura I.9:** Rendimiento porcentual (η) de los compuestos más volátiles en los residuos.

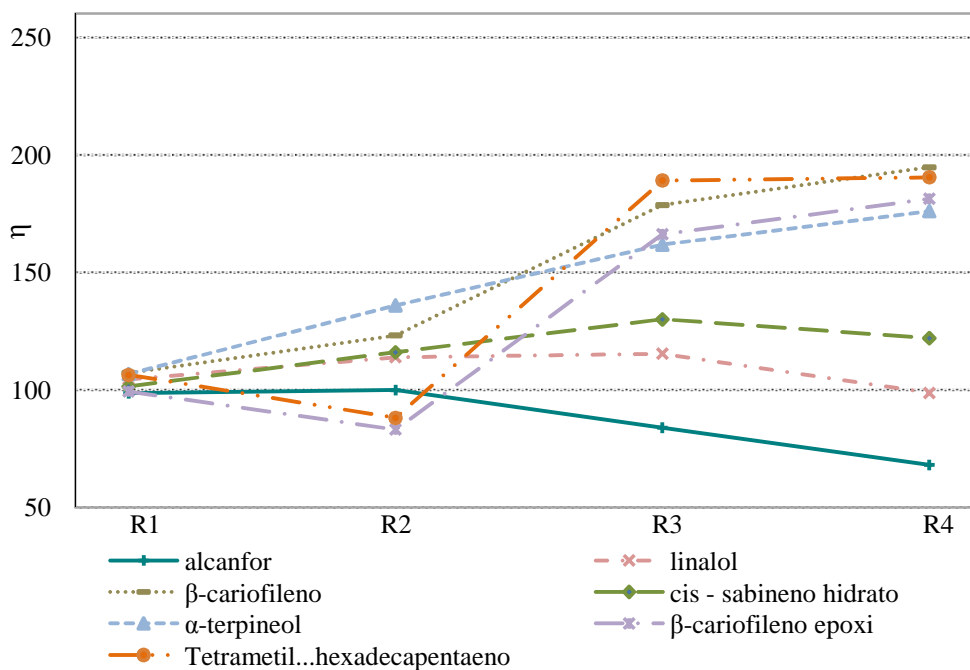


Figura I.10: Rendimiento porcentual (η) de los compuestos menos volátiles en los residuos.

Gráficas de concentraciones de los compuestos más y menos volátiles en los residuos.

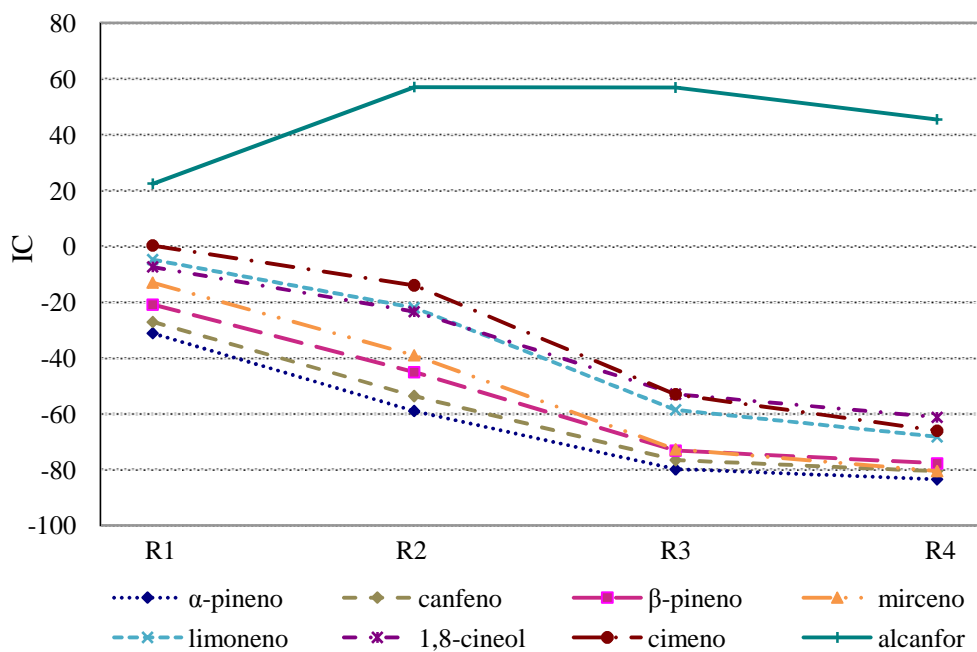


Figura I.11: Índices de concentración (IC) de los compuestos más volátiles en los residuos.

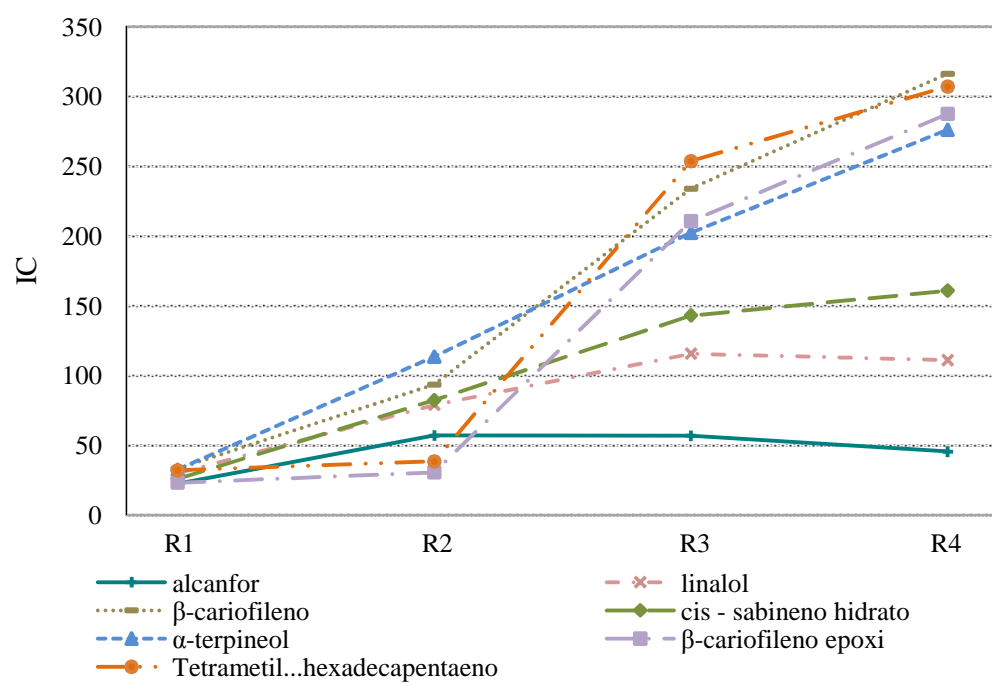


Figura I.12: Índices de concentración (IC) de los compuestos menos volátiles en los residuos.

Anexo II

A continuación se presentan los programas implementados en Matlab para la creación, entrenamiento y validación de la red neuronal artificial con estructura *backpropagation* que evalúa el efecto de la presión de operación, flujo de alimentación y composiciones de la entrada sobre el porcentaje de destilado obtenido. Además se presentan los resultados detallados de la implementación de las redes y programas implementados para realizar distintos gráficos en función de la red creada.

Programa de implementación de la red seleccionada:

```

% netdest

A=[0.1577  0.1577  0.1577  0.1577  0.1110  0.0540  0.0999
0.0600  0.0246  0.1577  0.0646  0.0317];
B=[0.0531  0.0531  0.0531  0.0531  0.0387  0.0200  0.0364
0.0230  0.0099  0.0531  0.0246  0.0124];
C=[0.0153  0.0153  0.0153  0.0153  0.0116  0.0062  0.0116
0.0077  0.0034  0.0153  0.0084  0.0041];
D=[0.0565  0.0565  0.0565  0.0565  0.0456  0.0257  0.0452
0.0307  0.0134  0.0565  0.0344  0.0154];
E=[0.0290  0.0290  0.0290  0.0290  0.0251  0.0158  0.0272
0.0213  0.0105  0.0290  0.0226  0.0120];
F=[0.2924  0.2924  0.2924  0.2924  0.2624  0.1811  0.2714
0.2174  0.1262  0.2924  0.2239  0.1375];
G=[0.0407  0.0407  0.0407  0.0407  0.0362  0.0245  0.0413
0.0335  0.0170  0.0407  0.0350  0.0191];
H=[0.2033  0.2033  0.2033  0.2033  0.2295  0.2548  0.2692
0.3311  0.3149  0.2033  0.3191  0.3188];
I=[0.0256  0.0256  0.0256  0.0256  0.0304  0.0434  0.0364
0.0496  0.0579  0.0256  0.0458  0.0552];
J=[0.0260  0.0260  0.0260  0.0260  0.0288  0.0470  0.0366
0.0518  0.0858  0.0260  0.0503  0.0868];
K=[0.0135  0.0135  0.0135  0.0135  0.0287  0.0231  0.0190
0.0274  0.0335  0.0135  0.0246  0.0328];
L=[0.0305  0.0305  0.0305  0.0305  0.0361  0.0534  0.0468
0.0687  0.0898  0.0305  0.0651  0.0922];
M=[0.0095  0.0095  0.0095  0.0095  0.0117  0.0218  0.0090
0.0115  0.0354  0.0095  0.0124  0.0295];
N=[0.0172  0.0172  0.0172  0.0172  0.0196  0.0332  0.0143
0.0189  0.0667  0.0172  0.0238  0.0608];
PR=[0.1446  1.0000  0.6386  1.0000  0.6627  0.0000  0.4578
0.1867  0.0542  1.0000  0.1867  0.0542];
FL=[0.5957  0.2766  1.0000  0.2128  0.1064  0.0000  0.0830
0.0340  0.0894  0.1064  0.1085  0.0766];
R=[0.0000  1.0000  0.0000  0.0000  0.0000  0.0000  1.0000
1.0000  1.0000  1.0000  1.0000  1.0000];

% Datos de entrada y salida de la red

in=[A; B; C; D; M; N; PR; FL];
DF=[1.0000  0.2760  0.3269  0.0221  0.0000  0.3453  0.2629
0.1648  0.1872  0.2619  0.1447  0.0305];
out=[DF];

% Creación de la red

netdest= newff(in,out,[10 1],{'tansig','logsig'},'trainlm');

```

```
% Entrenamiento de la red creada

netdest.divideParam.trainRatio = 100/100; % Adjust as desired
netdest.divideParam.valRatio = 0/100; % Adjust as desired
netdest.divideParam.testRatio = 0/100; % Adjust as desired
netdest.trainParam.epochs = 400;
netdest.trainParam.goal = 1e-4;
netdest.trainParam.max_fail = 1000;
netdest.trainParam.lr = 0.2;
netdest.trainParam.mc = 0.9;
netdest.trainParam.min_grad= 1e-30;
[netdest,tr39,y39,error39]=train(netdest,in,out)

save netdest

% Validación de la red

% Datos para validación

AP=[0.0831 0.1577 0.1085];
BP=[0.0299 0.0531 0.0387];
CP=[0.0093 0.0153 0.0121];
DP=[0.0385 0.0565 0.0491];
EP=[0.0215 0.0290 0.0276];
FP=[0.2321 0.2924 0.2707];
GP=[0.0317 0.0407 0.0408];
HP=[0.2321 0.2033 0.2488];
IP=[0.0352 0.0256 0.0332];
JP=[0.0349 0.0260 0.0346];
KP=[0.0182 0.0135 0.0170];
LP=[0.0409 0.0305 0.0404];
MP=[0.0148 0.0095 0.0117];
NP=[0.0252 0.0172 0.0227];
PRP=[0.2892 0.3976 0.4578];
FLP=[0.1064 0.7021 0.0234];
RP=[0.0000 0.0000 1.0000];

inP=[AP; BP; CP; DP; MP; NP; PRP; FLP];

DFP=[0.1229 0.4541 0.3131];

% Simulación después de entrenar

s39= sim(netdest,inP)
d39= s39-DFP

% Error generado en la validación de la red

desv39= (d39./DFP)*100
```

Tabla II.1: Resultados de las ANN estudiadas.

Variables de entrada	Regla de aprendizaje	<i>lr</i>	<i>Goal</i>	Iteraciones	Funciones de transferencia		Neuronas en capa oculta	R^2	<i>desv</i>
					Capa entrada	Capa oculta			
A; B; PR; FL	trainlm		1e-4	1000	logsig	tansig	5	0,99937	48.1770 33.9990 58.2543
A; B; PR; FL	trainlm		1e-4	1000	logsig	tansig	10	0,99993	57.7881 42.7618 69.6038
A; B; PR; FL	trainlm		1e-4	1000	logsig	tansig	15	0,91972	28.3247 80.1634 -49.6292
A; B; PR; FL	traingdm	0,2	1e-3	4000	logsig	tansig	5	0,94269	43.5577 1.1339 -48.826
A; B; PR; FL	traingdm	0,2	1e-3	4000	logsig	tansig	10	0,90991	39.4309 24.3126 -46.7277
A; B; PR; FL	traingdm	0,2	1e-3	4000	logsig	tansig	15	0,92154	24.8967 35.7468 -50.8721
A; B; C; D; M; N; PR; FL	trainlm		1e-3	1000	tansig	logsig	5	0,99266	8.6689 53.7273 20.3394
A; B; C; D; M; N; PR; FL	trainlm		1e-4	400	tansig	logsig	10	0,99998	-1.4302 -5.2238 6.6794

Tabla II.1 (Continuación): Resultados de las ANN estudiadas.

Variables de entrada	Regla de aprendizaje	<i>lr</i>	<i>Goal</i>	Iteraciones	Funciones de transferencia		Neuronas en capa oculta	R^2	<i>desv</i>
					Capa entrada	Capa oculta			
A; B; C; D; M; N; PR; FL	trainlm		1e-4	400	tansig	logsig	15	0,99999	2.2767 29.9296 26.8336
A; B; C; D; M; N; PR; FL	trainlm		1e-3	1000	logsig	tansig	5	0,99227	-17.8750 -18.8076 -5.1412
A; B; C; D; M; N; PR; FL	trainlm		1e-4	1000	logsig	tansig	10	1	24.4878 -10.1587 11.8040
A; B; C; D; M; N; PR; FL	trainlm		1e-4	1000	tansig	tansig	15	0,99983	41.0387 16.5415 43.8018
A; B; C; D; M; N; PR; FL	traingdm	0,2	1e-3	4000	logsig	tansig	5	0,91112	36.9405 15.9730 -45.3221
A; B; C; D; M; N; PR; FL	traingdm	0,2	1e-3	4000	logsig	tansig	10	0,91022	34.1313 47.5052 -39.4405
A; B; C; D; M; N; PR; FL	traingdm	0,2	1e-3	4000	logsig	tansig	15	0,93736	30.5418 17.9126 -34.1351
A; B; C; D; E; J; L; M; N; PR; FL	trainlm		1e-4	1000	logsig	tansig	5	0,91512	3.0886 -26.3521 16.2503

Tabla II.1 (Continuación): Resultados de las ANN estudiadas.

Variables de entrada	Regla de aprendizaje	<i>lr</i>	<i>Goal</i>	Iteraciones	Funciones de transferencia		Neuronas en capa oculta	R^2	<i>desv</i>
					Capa entrada	Capa oculta			
A; B; C; D; E; J; L; M; N; PR; FL	trainlm		1e-4	1000	logsig	tansig	10	1	11.1344 -0.7474 65.5680
A; B; C; D; E; J; L; M; N; PR; FL	trainlm		1e-4	1000	logsig	tansig	15	0,92854	17.6261 62.0598 -53.8116
A; B; C; D; E; J; L; M; N; PR; FL	traingdm	0,2	1e-3	4000	logsig	tansig	5	0,96661	17.4769 57.6626 -0.7786
A; B; C; D; E; J; L; M; N; PR; FL	traingdm	0,2	1e-3	4000	logsig	tansig	10	0,91632	21.5644 28.7567 -25.0432
A; B; C; D; E; J; L; M; N; PR; FL	traingdm	0,2	1e-3	4000	logsig	tansig	15	0,97227	-19.5530 46.2950 7.2224
A; B; C; D; E; F; G; H; I; J; K; L; M; N; PR; FL	trainlm		1e-4	1000	logsig	tansig	5	1	2.1220 116.7344 44.2022
A; B; C; D; E; F; G; H; I; J; K; L; M; N; PR; FL	trainlm		1e-4	1000	logsig	tansig	10	1	48.4727 -144.9766 52.5723
A; B; C; D; E; F; G; H; I; J; K; L; M; N; PR; FL	trainlm		1e-4	1000	logsig	tansig	15	0,91972	28.3247 102.7415 -49.6292

Tabla II.1 (Continuación): Resultados de las ANN estudiadas.

Variables de entrada	Regla de aprendizaje	<i>lr</i>	<i>Goal</i>	Iteraciones	Funciones de transferencia		Neuronas en capa oculta	R^2	<i>desv</i>
					Capa entrada	Capa oculta			
A; B; C; D; E; F; G; H; I; J; K; L; M; N; PR; FL	traingdm	0,2	1e-3	4000	logsig	tansig	5	0,9732	13.1188 56.9392 17.7333
A; B; C; D; E; F; G; H; I; J; K; L; M; N; PR; FL	traingdm	0,2	1e-3	4000	logsig	tansig	10	0,91992	21.0103 35.5200 -14.4167
A; B; C; D; E; F; G; H; I; J; K; L; M; N; PR; FL	traingdm	0,2	1e-3	4000	logsig	tansig	15	0,96949	35.9383 51.4853 19.6588
A; B; D; E; F; G; H; I; J; L; PR; FL	trainlm		1 e-5	4000	tansig	logsig	15	0,9999	-33.4277 39.9251 -24.5944
A; B; D; E; F; G; H; I; J; L; PR; FL	traingdm	0,2	1e-3	4000	tansig	logsig	15	0,9689	-45.7324 53.7672 -2.3084
A; B; D; E; F; G; H; PR; FL	trainlm		1e-4	400	tansig	logsig	15	1	49.7800 8.1777 -28.5857
A; B; D; E; F; G; H; PR; FL	trainlm		1e-4	1000	tansig	logsig	15	0,99927	-46.9398 4.3185 39.2399
A; B; D; E; F; G; H; PR; FL	trainlm		1e-4	400	tansig	logsig	20	0,93067	7.3722 -21.0827 -10.2854

Arquitectura y resultados de la red elegida para el modelado de la destilación molecular:

netdest =

Neural Network object:

architecture:

 numInputs: 1

 numLayers: 3

 biasConnect: [1; 1; 1]

 inputConnect: [1; 0; 0]

 layerConnect: [0 0 0; 1 0 0; 0 1 0]

 outputConnect: [0 0 1]

 numOutputs: 1 (read-only)

numInputDelays: 0 (read-only)

numLayerDelays: 0 (read-only)

subobject structures:

 inputs: {1x1 cell} of inputs

 layers: {3x1 cell} of layers

 outputs: {1x3 cell} containing 1 output

 biases: {3x1 cell} containing 3 biases

 inputWeights: {3x1 cell} containing 1 input weight

 layerWeights: {3x3 cell} containing 2 layer weights

functions:

 adaptFcn: 'trains'

 divideFcn: 'dividerand'

 gradientFcn: 'gdefaults'

 initFcn: 'initlay'

 performFcn: 'mse'

 plotFcns: {'plotperform','plottrainstate','plotregression'}

 trainFcn: 'trainlm'

parameters:

 adaptParam: .passes

 divideParam: .trainRatio, .valRatio, .testRatio

 gradientParam: (none)

 initParam: (none)

 performParam: (none)

 trainParam: .show, .showWindow, .showCommandLine, .epochs,

 .time, .goal, .max_fail, .mem_reduc,

 .min_grad, .mu, .mu_dec, .mu_inc,

 .mu_max, .lr, .mc

weight and bias values:

 IW: {3x1 cell} containing 1 input weight matrix

 LW: {3x3 cell} containing 2 layer weight matrices

 b: {3x1 cell} containing 3 bias vectors

```
other:
  name: ''
  userdata: (user information)
```

```
tr39 =
  trainFcn: 'trainlm'
  trainParam: [1x1 struct]
  performFcn: 'mse'
  performParam: [1x1 struct]
  divideFcn: 'dividerand'
  divideParam: [1x1 struct]
  trainInd: [1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12]
  valInd: [1x0 double]
  testInd: [1x0 double]
  stop: 'Performance goal met.'
  num_epochs: 46
  best_epoch: 46
  goal: 1.0000e-004
  states: {1x8 cell}
  epoch: [1x47 double]
  time: [1x47 double]
  perf: [1x47 double]
  vperf: [1x47 double]
  tperf: [1x47 double]
  mu: [1x47 double]
  gradient: [1x47 double]
  val_fail: [1x47 double]
```

```
y39 =
Columns 1 through 8
 1.0001  0.2722  0.3266  0.0209  0.0021  0.3439  0.2635  0.1634
Columns 9 through 12
 0.1849  0.2622  0.1467  0.0288
```

```
error39 =
Columns 1 through 8
-0.0001  0.0038  0.0003  0.0012 -0.0021  0.0014 -0.0006  0.0014
Columns 9 through 12
 0.0023 -0.0003 -0.0020  0.0017
```

```
DFP =
 0.1229  0.4541  0.3131
```

```
s39 =
 0.1211  0.4304  0.3340
```

```
d39 =
-0.0018 -0.0237  0.0209
```

desv39 =

-1.4302 -5.2238 6.6794

Reducción de dimensiones en datos de entrada de la red utilizando Componentes Principales:

Análisis de componentes principales

Datos originales (no estandarizados)

Casos leídos 15

Casos omitidos 0

VARIABLES DE CLASIFICACIÓN

Caso

Autovalores

Lambda	Valor	ProporciónProp	Acum
1	0,135	0,627	0,627
2	0,080	0,369	0,997
3	0,001	0,003	1,000
49,3E-05	4,3E-04		1,000
53,1E-06	1,4E-05		1,000
69,0E-07	4,2E-06		1,000
73,4E-08	1,6E-07		1,000
81,8E-09	8,3E-09		1,000

Autovectores

Variables	e1	e2
A	0,120	0,045
B	0,038	0,014
C	0,010	0,003
D	0,035	0,010
M	-0,015	-0,002
N	-0,027	-0,003
PR	0,920	-0,378
FL	0,369	0,925

Correlaciones con las variables originales

Variables	CP 1	CP 2
A	0,879	0,254
B	0,876	0,241
C	0,866	0,219
D	0,846	0,186
M	-0,657	-0,066
N	-0,611	-0,046
PR	0,954	-0,301
FL	0,461	0,887

CP 1	CP 2
-0,126	0,447
0,146	0,449
0,477	0,634
0,519	-0,230
0,163	-0,205
-0,185	-0,065
-0,495	-0,055
0,543	-0,171
-0,035	-0,149
-0,309	-0,094
-0,418	0,005
0,480	-0,329
-0,057	-0,204
-0,280	-0,025
-0,421	-0,006

Programa para realizar la gráfica de los valores obtenidos en la red (*Sal exp*) en función de las componentes CP1 y CP2 (Figura 6.16):

```
function [fitresult, gof] = createSurfaceFit(CP1, CP2, Outb)
%CREATESURFACEFIT(CP1,CP2,OUTB)
% Fit surface to data.
% Data for 'untitled fit 1' fit:
%   X Input : CP1
%   Y Input : CP2
%   Z output: Outb
%   Weights : (none)
% Output:
%   fitresult : an sfit object representing the fit.
%   gof : structure with goodness-of fit info.
% See also FIT, SFIT.
% Auto-generated by MATLAB on 26-Oct-2014 09:57:13
%% Initialization.
% Convert all inputs to column vectors.

CP1 = CP1(:);
CP2 = CP2(:);
Outb = Outb(:);

%% Fit: 'untitled fit 1'.
ft = fittype( 'poly41' );
opts = fitoptions( ft );
opts.Lower = [-Inf -Inf -Inf -Inf -Inf -Inf -Inf -Inf -Inf];
opts.Upper = [Inf Inf Inf Inf Inf Inf Inf Inf Inf];
opts.Weights = zeros(1,0);
[fitresult, gof] = fit( [CP1, CP2], Outb, ft, opts );
```

```
% Create a figure for the plots.
figure( 'Name', 'untitled fit 1' );

% Plot fit with data.
subplot( 2, 1, 1 );
plot( fitresult, [CP1, CP2], Outb );
% Label axes
xlabel( 'CP1' );
ylabel( 'CP2' );
zlabel( 'Outb' );
grid on
view( -121.5, 54 );

% Make contour plot.
subplot( 2, 1, 2 );
plot( fitresult, [CP1, CP2], Outb, 'Style', 'Contour' );
% Label axes
xlabel( 'CP1' );
ylabel( 'CP2' );
grid on
```

Divulgación de resultados

Parte de los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral dieron lugar a las siguientes publicaciones y presentaciones en reuniones científicas.

Trabajos publicados

“*Oxidative Stability Of Sunflower Oil With The Addition Of Rosemary Essential Oil Fractions Enriched In Antioxidant Activity Obtained By Short Path Molecular Distillation*”, Gabriela N. Mezza; Nelson R. Grosso; Héctor Fernandez; María F. Gayol y María C. Pramparo; *Food Chemistry*, en etapa de revision.

“*Obtention of Rosemary Essential Oil Concentrates by Molecular Distillation and Free Radical Scavenging Capacity Analysis*”, G. N. Mezza, A. V. Borgarello, J. D. Daguerro, M. C. Pramparo. *International Journal of Food Engineering*, 9 (2) 147-153, 2013.

“*Use of a free radical scavenging method on extracts obtained by molecular distillation from oregano essential oil*”, A. V. Borgarello, G. N. Mezza, A. T. Soltermann, y M. C. Pramparo. *Latin American Applied Research*, 44: 25-30, 2014.

“*D-limonene and Geranial fractionation from lemon essential oil by molecular distillation*” P. C. Rossi, A. A. Willnecker, J. Berti, A. V. Borgarello, G. N. Mezza y M. C. Pramparo. *Latin American Applied Research*, 41: 81-85, 2011.

Presentaciones en reuniones científicas

“*Fraccionamiento de aceite esencial de romero por destilación molecular*”. G. Mezza, A. Borgarello, M. Gayol y M. Pramparo. *Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas*. Marzo de 2012.

“Estudio de la influencia de variables operativas en la obtención de fracciones de aceite esencial de orégano mediante destilación molecular”. A. Borgarello, A. Solterman, G. Mezza y M. Pramparo. *Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas*. Marzo de 2012.

“Influencia de condiciones operativas en la concentración por destilación molecular de nutraceuticos presentes en el aceite esencial de romero”, G. N. Mezza, J. A. Zygadlo, A. V. Borgarello y M. C. Pramparo, *VI Congreso Argentino de Ingeniería Química*, 2010.

“Utilización de un método de captación de radicales libres para la determinación de propiedades antioxidantes de aceite esencial de orégano concentrado por destilación molecular”, A., Borgarello; A., Soltermann; G., Mezza; M. Pramparo, *VI Congreso Argentino de Ingeniería Química*, 2010.