



**TRABAJO DE TITULACIÓN PRESENTADO COMO REQUISITO PREVIO
PARA OPTAR AL GRADO DE QUÍMICO Y FARMACÉUTICO**

AUTOR

Eduardo Ignacio Meza Ipanaqué

TEMA

**Extracción y evaluación del aceite esencial de las cáscaras de la naranja
dulce (*Citrus sinensis*)**

TUTORA:

Q.F. Giomara Quizhpe Monar, MSc

CO - TUTORA

Q.F. Soraya García Larreta, MSc

GUAYAQUIL – ECUADOR

2016 – 2017

APROBACIÓN DEL TUTOR

En calidad de tutor /a del Trabajo de Titulación, Certifico: Que he asesorado, guiado y revisado el trabajo de titulación en la modalidad de investigación, cuyo título es Extracción y evaluación del aceite esencial de las cáscaras de la naranja dulce (Citrus sinensis), presentado por Eduardo Ignacio Meza Ipanaqué, con cédula de ciudadanía N° 0931007157, previo a la obtención del título de Químico y Farmacéutico.

Este trabajo ha sido aprobado en su totalidad y se adjunta el informe de Anti plagio del programa URKUND. Lo Certifico.-

Guayaquil, (indicar mes) 2017

MSc Giomara Quizhpe Monar
FIRMA TUTOR DE TESIS

MSc. Soraya García Larretta
FIRMA CO-TUTOR DE TESIS

CERTIFICADO DEL TRIBUNAL

El Tribunal de Sustentación del Trabajo de Titulación del Sr. Eduardo Ignacio Meza Ipanaqué, después de ser examinado en su presentación, memoria científica y defensa oral, da por aprobado el Trabajo de Titulación.

Lcdo. ADONIS BELLO ALARCON, PHD
PRESIDENTE - MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Lcda. MERIBARY MONSALVE P, PHD
DOCENTE-MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Q.F.KATHERINE BUSTAMANTE P, MG
DOCENTE-MIEMBRO DEL TRIBUNAL

ING.NANCY VIVAR CACERES
SECRETARIA ENCARGADA

CARTA DE AUTORIA DE TITULACIÓN

Escribir máximo en un cuarto de página Letra: Arial. Tamaño: 11

Fecha

Yo, Eduardo Ignacio Meza Ipanaqué, autor de este trabajo declaro ante las autoridades de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Guayaquil, que la responsabilidad del contenido de este TRABAJO DE TITULACIÓN, me corresponde a mí exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Guayaquil.

Declaro también es de mi autoría, que todo el material escrito, salvo el que está debidamente referenciado en el texto. Además, ratifico que este trabajo no ha sido parcial ni totalmente presentado para la obtención de un título, ni en una Universidad Nacional, ni una Extranjera.

Eduardo Ignacio Meza Ipanaqué

C.I. 0931007157

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mis padres por apoyarme, por creer en mí y cuidarme, por ser mis mejores amigos, darme la oportunidad de ser quien soy, y por acompañarme cada día de mi vida.

Un agradecimiento muy especial a las Dras. Mariana Rendón, y Alexandra Quezada por haberme facilitado el uso del laboratorio donde realicé la extracción del aceite esencial, al Dr. Oswaldo Pesantes por facilitarme materiales del laboratorio sin los cuales esta investigación no hubiera sido posible, a la generosa colaboración de la Dra. Tatiana por haberme orientado con la inducción de análisis instrumental, y mis tutoras Dras. Giomara Quishpe Monar y Soraya García Larretta por su constante dedicación, consejos en la redacción de mi tesis, y apoyo en mi desarrollo como futuro profesional.

Agradezco a mis oponentes por la lectura, revisión y sus sabias observaciones que me ayudaron a mejorar mi trabajo de graduación.

Agradezco a mis compañeros de estudio por acompañarme y compartir estos seis largos años en las buenas y las malas.

Índice General

| | |
|---|----------|
| Introducción | 1 |
| Formulación del Problema | 3 |
| Planteamiento del problema..... | 3 |
| Hipótesis | 4 |
| Justificación..... | 4 |
| Objetivo General..... | 5 |
| Objetivos específicos | 5 |
| 1. Generalidades..... | 6 |
| 1.2. Partes de la naranja | 7 |
| 1.3. Aceites esenciales de la naranja | 8 |
| 1.5. Biosíntesis de los compuestos terpénicos | 10 |
| 1.6. Clasificación de aceites esenciales | 10 |
| 1.7. Antioxidantes..... | 11 |
| 1.8. Función de los aceites esenciales | 13 |
| 1.10. Flavonoides | 19 |
| 1.10.1. Clasificación de los flavonoides | 20 |
| 1.11. Técnicas de extracción de aceites esenciales | 21 |
| 1.12. Tipos de extractos según su consistencia..... | 23 |
| 1.13. Métodos para determinar actividad anti oxidante | 23 |
| 1.14. Propiedades físicas y químicas..... | 24 |
| 1.14.1. Densidad | 24 |
| 1.14.2. Índice de refracción | 24 |
| 1.14.3. pH (Potencial de Hidrógeno) | 25 |
| 1.14.4. Solubilidad | 25 |
| 1.15. Cromatografía de gases | 26 |
| 2.2. Selección de la materia prima..... | 32 |
| 2.2.1. Tratamiento de la materia prima | 32 |
| 2.3. Extracción del aceite esencial de la naranja..... | 32 |
| 2.4. Extracción por arrastre de vapor..... | 33 |

| | | |
|--------|--|----|
| 2.5. | Decantación | 33 |
| 2.6. | Cálculo del rendimiento..... | 34 |
| 2.7. | Prueba para evaluar la capacidad antioxidante del extracto..... | 34 |
| 2.8. | Determinación de la composición del aceite esencial por cromatografía de gas | 35 |
| 2.9. | Propiedades físicas..... | 36 |
| 2.9.1. | Densidad..... | 36 |
| 2.9.2. | Índice de refracción..... | 36 |
| 2.9.3. | pH | 37 |
| 2.9.4. | Solubilidad..... | 37 |
| 3. | RESULTADOS Y DISCUSIONES | 38 |
| 3.1. | Rendimiento | 38 |
| 3.2. | Determinación del índice de refracción | 39 |
| 3.3. | Determinación de la densidad..... | 40 |
| 3.4. | Análisis organoléptico..... | 40 |
| 3.5. | Ensayo de solubilidad..... | 41 |
| 3.6. | Evaluación de capacidad anti oxidante por captación de radicales libre método de (DPPH)..... | 42 |
| 3.7. | Análisis cromatográfico del aceite esencial de la naranja dulce (citrus sinensis)..... | 43 |
| 3.8. | Caracterización de componentes en aceites esenciales por diferentes autores | 44 |
| 3.9. | Estudio comparativo de caracterización de la fracción predominante en aceite esencial D-Limoneno de cáscaras de naranja (citrus sinensis)..... | 47 |
| | Bibliografía | 51 |

| ÍNDICE DE GRÁFICOS | Página |
|---|--------|
| Gráfico I Cromatograma analítico gaseoso aceite esencial de naranja..... | |
| 51 | |
| Gráfico II Cromatograma analítico gaseoso aceite esencial de naranja..... | 68 |
| Gráfico III Cromatograma 3D..... | 68 |
| Gráfico VI Analizador de cuadrupolos..... | 69 |
| Gráfico V Analizador de tiempo de vuelo..... | 69 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Página |
|--|--------|
| Tabla I Propiedades físico-químicas D-Limoneno | 28 |
| Tabla II Clasificación de extractos según sus aspectos | 34 |
| Tabla III Rendimiento de la muestra | 47 |
| Tabla IV Propiedades físicas del extracto obtenido en el presente trabajo de investigación | 48 |
| Tabla V Solubilidad del aceite esencial del extracto obtenido en el presente trabajo de investigación | 49 |
| Tabla VI Caracterización de compuestos del extracto obtenido | 50 |
| Tabla VII Caracterización de los compuestos | 52 |
| Tabla VIII Caracterización de los compuestos | 52 |
| Tabla IX Caracterización de los compuestos | 53 |
| Tabla X Caracterización de los compuestos | 54 |
| Tabla XI Comparación de fracción predominante | 54 |
| Tabla XII Terpenos de mayor interés..... | 72 |
| Tabla XIII Derivados de los terpenos de gran importancia..... | 73 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| Anexo I | Página |
|--|--------|
| Imagen I Cáscaras para destilar..... | 63 |
| Imagen II Troceado de la cascara..... | 63 |
| Imagen III Picnómetro vacío..... | 63 |
| Imagen IV Picnómetro lleno..... | 63 |
| Imagen V Destilación..... | 64 |
| Imagen VI Pesado de la muestra..... | 64 |
| Imagen VII Refractómetro..... | 64 |
| Imagen VIII Refractómetro..... | 64 |
| Imagen IX Armado del equipo vacío..... | 65 |
| Imagen X Armado del equipo lleno..... | 65 |
| Imagen XI Extracto..... | 65 |
| Imagen XII Cáscaras de naranja..... | 65 |
| Imagen XIII Decantado del extracto..... | 66 |
| Imagen XIV Recolección del extracto..... | 66 |
| Imagen XV Decantado del extracto..... | 66 |
| Imagen XVI Decantado del extracto..... | 66 |
| Imagen XVII Balanza..... | 67 |
| Imagen XVIII Pesado de la muestra..... | 67 |

| Anexo II | Página |
|-------------------------------------|--------|
| Ficha técnica de materia prima..... | 69 |
| Certificado de análisis..... | 70 |

RESUMEN

Esta investigación se realizó para evaluar las propiedades físicas y químicas del aceite esencial de las cáscaras de naranja dulce (*citrus sinensis*) además de la caracterización de sus fracciones utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. El extracto analizado tuvo una densidad de 0.859, el índice de refracción fue de 1.4707, el pH fue de 6.4, el aceite esencial de la cascara de naranja es parcialmente soluble en metanol y etanol, es insoluble en agua, en éter etílico es soluble 100%, y en cetona 50% es soluble. El aceite esencial mostro una capacidad de captación de radicales libres resultó ser del 4.5% del aceite esencial de las cáscaras de naranja dulce (*citrus sinensis*). Se caracterizó las fracciones que conforman el aceite esencial de la cáscara de naranja dulce (*citrus sinensis*), y se logró identificar D-limoneno con 96.73% de abundancia, beta-mirceno con 1.20% de abundancia y 3-careno con 0.74% de abundancia. Luego, se comparó los resultados de esta investigación con otros estudios similares para confirmar la veracidad de los resultados. Además, de demostrar la predominancia del D-limoneno.

Palabras claves: aceite esencial, citrus sinensis, D-Limoneno, monoterpeneo

ABSTRACT

This research intended to evaluate the physical and chemical properties of the essential oil of sweet orange peels (*Citrus sinensis*) and the characterization of their fractions using chromatography of gases. The density was 0.859, the refractive index was 1.4707, the pH was 6.4, the solubility was 100% partially soluble methanol, 100% partially ethanol, insoluble water, soluble ethyl ether and 50% soluble ketone. The capacity of free radical scavenging was found to be 4.5% of the essential oil of sweet orange peels (*Citrus sinensis*). The fractions that make up the essential oil of the sweet orange peel (*Citrus sinensis*) were characterized. It was possible to identify D-limonene with 96.73% of abundance, beta-myrcene with 1.20% of abundance and 3-carene with 0.74% of abundance. The results were compared with similar studies to confirm their accuracy. In addition, it was found the predominance of D-limonene in the peels of *Citrus sinensis*.

Key words: essential oil, *Citrus sinensis*, D-limonene, monoterpene

Introducción

Los aceites esenciales están presentes en nuestra vida cotidiana en el sabor y olor característico de los alimentos que consumimos esto se debe a las sustancias químicas que se encuentran presentes en ellos; los aceites esenciales son de origen tanto vegetal como animal, encontrándose que algunas especies evolucionaron con niveles muchos mayores de estas sustancias químicas que otras. Con la invención de la destilación por arrastre de vapor y la extracción por prensa, es posible aislar del material botánico estas sustancias o sus mezclas por medio de procesos físicos los cuales no dañan la muestra, dando lugar al nacimiento de los aceites esenciales como producto comercial; esta materia prima posee varias fracciones de terpenos, terpenoides, aldehídos, cetonas etc. (Aguilera, 2015)

Estas sustancias se las caracteriza por cromatografía de gas y luego para su identificación se emplean los tiempos de retención respecto a estándares comerciales y los espectros de masas característicos. Los aceites esenciales son una materia prima muy usada a nivel industrial debido a la inmensa variedad de productos que se pueden elaborar a partir de ellos. Los aceites esenciales son fáciles de obtener, su extracción es económica al igual que su fuente de origen ya que estos se los puede obtener de las cáscaras vegetales, las mismas que son consideradas desperdicios o desechos orgánicos por las personas que desconocen su potencial (Martínez, 2014).

Los aceites esenciales también conocido como aceites etéreos son fracciones líquidas volátiles que se originan por biosíntesis mezclando varias sustancias químicas metabolizadas por las plantas, que dan el aroma característico de algunas flores, árboles, frutos, hierbas, especias, semillas y a ciertos extractos de origen animal (almizcle, civeta y ámbar gris), las cuales se pueden obtener por arrastre de vapor preferiblemente, usando agua como

solvente debido a que es inmiscible en ella; los aceites esenciales son responsables de los aromas de las plantas, estos se emplean en la industria para la elaboración de diferentes productos en los cuales se los emplea como aditivos para generar aromas, sabores, e incluso como desengrasantes (Martínez, 2014)

Los aceites esenciales provenientes de las cáscaras de los cítricos se caracterizan por ser ricos en D-limoneno, el cual se encuentra en la vesículas de las cáscaras para su extracción, por tanto es preferible darle a la cáscara un tratamiento previo con un remojo de al menos 2 horas para que las vesículas que lo contienen logren soltar una mayor cantidad de aceites esenciales. Estos están principalmente conformados por limoneno; este hidrocarburo es un monoterpeno de alta demanda a nivel industrial debido a su versatilidad como materia prima; se lo puede emplear en la elaboración de productos varios desde desengrasantes hasta confites. (García, 2009)

Los países Latino Americanos se caracterizan por ser productores de cítricos lo cual hace fácil la obtención de la materia prima para la extracción del D-limoneno. Además, el proceso de extracción es sumamente barato y su precio en el mercado latino americano varía desde 6 dólares hasta 20 dólares el litro, dependiendo de la provincia y el país. (ESPAC, 2015)

Formulación del Problema

¿De qué manera incide la extracción por arrastre de vapor en la pureza del aceite esencial de la cascara de naranja dulce (*citrus sinensis*)?

Planteamiento del problema

La naranja dulce (*citrus sinensis*) es un recurso muy común en nuestro medio. Es uno de los principales cítricos que se produce a gran escala en Latino América del cual solo se aprovecha la pulpa para la elaboración de jugos dejando de lado sus cáscaras como un desecho orgánico sin valor. En Ecuador se produce grandes cantidades de cítricos, tan solo en la provincia de Bolívar se plantó 11.365 hectáreas métricas y se cosechó 9.980 hectáreas métricas de naranja dulce (*citrus sinensis*) en el año 2015; la producción fue de 57,323 toneladas métricas que equivalió el 49.07% de la producción nacional del año 2015 (ESPAC, 2015).

La producción de naranjas que el Ecuador exportó desde el 2007 hasta el 2012 fue de 26,340 toneladas métricas de naranja (PRO ECUADOR, 2012), Ecuador por ser un país exportador de naranjas cuenta con la suficiente materia prima para extraer aceites esenciales y demás sustancias orgánicas de las diferentes partes de la naranja que no se consume dado que la pulpa comprende el 80% del fruto aún es posible optimizar el aprovechamiento del 20% no utilizado; estas fracciones del fruto comprende el flavedo, albedo y residuos de los hollejos. (FEED, RSS, 2011). Las principales provincias productoras de naranjas son: Bolívar, Manabí, Los Ríos, y Cotopaxi. (PRO ECUADOR, 2016). Específicamente, el aprovechamiento industrial de los cítricos se ha convertido en una actividad intensiva en donde participan empresas dedicadas a toda la cadena productiva (cultivadores, procesadoras, centros de distribución y exportadores), produciendo jugos, pulpas, concentrados y frutas en fresco; pero a medida que la producción crece, se aumenta también la generación de

residuos sólidos y líquidos, los cuales están compuestos principalmente de agua, azúcares solubles, fibra, ácidos orgánicos, aminoácidos, minerales, aceites esenciales, flavonoides y vitaminas, estando en cantidades diferentes dependiendo de la parte de la fruta que se los extraiga (jugo, cáscara, pulpa, mesocarpio), su estado de madurez y el sistema empleado para la extracción del jugo. Estos residuos sólidos no están siendo aprovechados y se los cataloga como desechos orgánicos sin valor.

Hipótesis

La extracción del aceite esencial de naranja (*citrus sinensis*) por destilación de arrastre de vapor permite obtener D-limoneno de alta pureza.

Justificación

Este trabajo se lleva a cabo para caracterizar las distintas fracciones del aceite esencial de naranja dulce (*citrus sinensis*) y determinar la proporción en la que sus compuestos están presentes; es posible el aprovechamiento de la cáscara de naranja (*citrus sinensis*) una vez que los productores, y los sectores industriales reconozcan el valor de esta materia prima que está siendo desperdiciada y no valorada en nuestro país. El alto índice de producción de este cítrico en el Ecuador -alrededor de 100.000 toneladas métricas anuales- favorece a la explotación de este recurso. Por medio de los métodos de Destilación por Arrastre de Vapor o de Prensado podemos obtener el aceite esencial de la cáscara de la naranja, éste puede ser empleado en la elaboración de productos en diferentes industrias, por lo que es altamente comerciable; se emplea en la elaboración de diversos productos tales como desengrasantes, edulcorantes, aromatizantes y disolventes. (FEED, RSS, 2011)

Una vez extraído el aceite esencial el epicarpio utilizado para la extracción aún puede ser usado para elaboración de fertilizantes y piensos ya que se genera una moderada variedad de vitaminas y otros nutrientes como un sub producto de la biosíntesis de los terpenos y terpenoides en las cáscaras de naranja dulce (*citrus sinensis*). Existen otras partes de la naranja que no se aprovecha por la falta de conocimiento, por ejemplo el albedo es una estructura blanca esponjosa que se puede aprovechar para elaborar mermeladas y otros tipos de confite debido a la presencia de glucósidos en su estructura, también posee pectinas las cuales pueden ser utilizadas en industria alimentaria, y en la industria cosmética, pues son agentes gelificantes que se pueden emplear en la industria farmacéutica; las pectinas también abundan en los hollejos. (Martínez Vàsquez, 2014)

Objetivo General

Evaluar el aceite esencial de la cáscara de naranja (*citrus sinensis*) extraído por arrastre de vapor para la caracterización de sus fracciones.

Objetivos específicos

1. Extraer el aceite esencial de la cáscara de naranja (*citrus sinensis*) mediante la técnica de Arrastre de vapor.
2. Determinar las propiedades físico-químicas del aceite esencial obtenido de la cáscara de naranja (*citrus sinensis*).
3. Realizar estudio comparativo con investigaciones similares.

CAPÍTULO I

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Generalidades

El naranjo es un árbol que pertenece a la familia de las rutáceas, según la parte usada se puede adquirir diferentes clases de materias primas. El fruto está dividido en aproximadamente diez pequeños huecos unidos entre sí y en cuyo interior crecen las semillas y los sacos de zumo, en el flavedo son importantes los pigmentos y los aceites esenciales. Los pigmentos dan su color amarillo o anaranjado a los frutos. (Martínez Vázquez, 2014)

Antes de madurar predomina el color verde del pigmento clorofila (el mismo que tienen las hojas). A medida que la fruta va madurando aparecen los carotenoides que estaban enmascarados por la clorofila. Pueden utilizarse sustancias que destruyen la clorofila para acelerar la aparición de los carotenoides (desverdización), la naranja posee caroteno, xantofila y criptoxantina (García, 2015).

Las naranjas se caracterizan por ser el cítrico con la mayor concentración de caroteno, le siguen las mandarinas y se encuentra en muy pequeña cantidad en otros cítricos. En las naranjas la concentración de carotenos está en un rango de 30 a 300 miligramos por kilo de cáscara empleada; la mandarina posee una concentración de 80 a 140 mg por kilo de cáscara y en los demás cítricos de 1 a 5 miligramos por kilo de peso; en la corteza del limón existen flavonas (que son otros pigmentos) en mucha mayor proporción que las naranjas (1,5 miligramos en limón; 0,08 miligramos en naranjas) los aceites esenciales se encuentran almacenados en vesículas de la corteza. En las naranjas y mandarinas predomina el limoneno; en los limones existen además de limoneno otros terpenos. Los diferentes elementos que constituyen los aceites esenciales se encuentran en diferentes concentraciones, aquellos que se encuentran en la

corteza serán responsables del aroma característico del fruto (FEED, RSS, 2011).

La glucosa es el azúcar con mayor concentración en los frutos representa al menos el (63%) del fruto son azúcares, la fructosa (20%) y la sacarosa (16%). Los cítricos poseen grandes cantidades de pectinas en su albedo los cuales son capaces de absorber el agua para formar geles los cuales se emplean en la elaboración de diferentes productos como por ejemplo mermeladas (Arèalo, 2013)

A parte del albedo los glucósidos pueden estar contenidos en otras partes de las frutas, como en el jugo de los cítricos. La hesperidina es un elemento muy importante en los cítricos ayuda al fruto a resistir bajas temperaturas formando cristales insolubles que protegen la pulpa de los cítricos principalmente. (García, 2009)

1.2. Partes de la naranja

Partes principales de la naranja:

- **El exocarpo o flavedo:** exocarpo o flavedo es lo que se conoce como cáscara los cítricos constan de una epidermis verde que con el tiempo va tomando colores característicos de una maduración esto se debe a que cuando el cítrico posee clorofila mezclada entre sus pigmentos característicos que con el tiempo van desapareciendo producto de la maduración, en las cáscaras se encuentran vesículas que poseen los aceites esenciales que les da sus aromas características entre otros atributos como medio de defensa ante plagas. (Lado, 2010)

- **Mesocarpo o Albedo:** esta estructura es una piel blanca suave y esponjosa rica en pectinas se encuentra bajo la cáscara recubriendo los hollejos tiene una cantidad de glucósidos alta lo cual es útil en la elaboración de mermeladas. (Maldonado, 2014)
- **Endocarpo o pulpa:** esta es la parte consumible que se usa como alimento; ésta es la estructura predominante, comprende aproximadamente el 80 % del cítrico, la pulpa comprende sacos que contiene los jugos, semillas y carnosidades de los cítricos, también posee agua y azúcares; entre sus jugos se encuentran mezclados los diferentes ácidos orgánicos característicos de los cítricos como por ejemplo la vitamina C (Maldonado, 2014)

1.3. Aceites esenciales de la naranja

Los aceites esenciales son componentes volátiles que están comúnmente concentrados en la cáscara de la naranja (*Citrus senensis*), éstos son de origen terpénicos ya que están formados por monoterpenos y sesquiterpenos que a su vez están comprendidos por varias fracciones de isoprenos y se encuentran usualmente en formaciones acíclicas, estos aceites esenciales no suelen ser oleosos, son fáciles de extraer por destilación y por maceración usando el solvente adecuado, entre ellos tenemos: alcohol, aceite, agua. (Pizarro, 2015)

1.4. Composición química de los aceites esenciales

Los aceites esenciales en los cítricos se encuentran almacenados en las vesículas de las cáscaras, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y

aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (saborizantes). Los aceites esenciales pueden estar constituidos por mezclas complejas de hasta más de 100 componentes que pueden ser: Compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos. En su gran mayoría son de olor agradable, aunque existen algunos de olor relativamente desagradable como por ejemplo los del ajo y la cebolla, los cuales contienen compuestos constituidos por azufre (Martínez Vázquez, 2014)

Los aceites esenciales tienen la tendencia a tener capacidades antioxidantes y actividad antimicrobiana por ejemplo la pimienta, la albahaca, el laurel, el clavo, la canela, la cúrcuma, el eucalipto, el extracto de semilla de toronja, el orégano, la páprika, el rábano, el romero, la salvia, el tomillo, la valeriana (Sepulveda, 2012)

El aceite esencial de naranja está generalmente conformado por las siguientes fracciones monoterpenos (M), sesquiterpenos (S) y compuestos oxigenados (CO). Los monoterpenos son hidrocarburos que tienen en su estructura dos unidades isoprenicas (C₅ H₈) y los sesquiterpenos poseen tres de estas unidades. (Berbesi, 2007)

Los compuestos oxigenados son los mayores contribuyentes en el olor y sabor característico de los aceites esenciales. Sin embargo, los monoterpenos y sesquiterpenos también contribuyen pero en una pequeña proporción. Por ejemplo, en el caso de los cítricos, el butirato de etilo da una nota a fruta madura, el trans-2-hexanal aporta un olor a hojas verdes, el 1,8-cineol a eucalipto, el borneol a tierra y los aldehídos n-octanal y citral (Aguilera, 2015).

Los aceites esenciales son fotosensibles y además son muy susceptibles a la biodegradación, al punto que es posible que se dé un reordenamiento estructural, esta transformación puede causar la emanación de olores en el caso de aceites esenciales que han sido almacenados. Además, los monoterpenos, a diferencia de sus derivados oxigenados son poco solubles en agua, lo que limita mucho su uso en productos de perfumería. Por lo tanto, es conveniente remover parcial o totalmente estos compuestos para aumentar la vida útil del producto (Pizarro, 2015)

1.4.1. Hidrocarburos Monoterpénicos

Los hidrocarburos monoterpénicos son los principales compuestos que conforma a los aceites esenciales incluso pueden ser terpenos oxidados. Los hidrocarburos monoterpénicos se nombran terminando en – *eno*. Por ejemplo, el limoneno, es el precursor de los principales componentes de la esencia de las mentas. El limoneno se encuentra también en cítricos y en el eneldo. También los compuestos α y β - pineno se encuentran muy ampliamente distribuidos en la naturaleza, especialmente en la esencia de trementina (Osorio, 2015).

1.5. Biosíntesis de los compuestos terpénicos

La ruta del acetyl coenzima y el ácido mevalónico son los responsables de la síntesis de los terpenos y terpenoides naturales. Sin embargo, recientemente se ha encontrado que algunos terpenoides no se originan por esta ruta, sino por una ruta alterna que puede involucrar piruvato, gliceraldehído-3-fosfato y un intermedio de 5 átomos de carbono: 1-desoxi-xilulosa-5-fosfato (García, 2009).

1.6. Clasificación de aceites esenciales

Los aceites esenciales pueden ser clasificados por su composición química o por su consistencia. De acuerdo con su consistencia los aceites esenciales se clasifican en esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas. Las

Esencias fluidas son líquidos volátiles a temperatura ambiente. Los Bálsamos son de consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización (Pizarro, 2015)

Las oleorresinas se caracterizan por poseer el aroma concentrada de las plantas de las que son extraídas también se caracterizan por tener alta viscosidad que incluso puede llegar a ser semisólido por ejemplo: (caucho, gutapercha, chicle, balata, oleorresina de paprika, de pimienta negra, de clavel, etc.). (Pizarro, 2015)

De acuerdo a su origen los aceites esenciales se clasifican como naturales, artificiales y sintéticas. Los naturales se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, debido a su rendimiento tan bajo son muy costosas. Los artificiales se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes, por ejemplo, la mezcla de esencias de rosa, geranio y jazmín enriquecida con linalool, o la esencia de anís enriquecida con anetol (Soto, 2012)

Los aceites esenciales sintéticos como su nombre lo indica son los producidos por la combinación de sus componentes los cuales son la mayoría de las veces producidos por procesos de síntesis química. Estos son más económicos y por lo tanto son mucho más utilizados como aromatizantes y saborizantes (esencias de vainilla, limón, fresa, etc.) (Martínez, 2014)

1.7. Antioxidantes

Los antioxidantes son moléculas cuyo efecto retrasa los procesos metabólicos retrasando procesos enzimáticos. La oxidación es la transferencia de electrones de una sustancia a una sustancia oxidante. Las reacciones de

oxidación pueden generar radicales libres que inician reacciones consecutivas que afectan a las células. Los antioxidantes detienen estas reacciones quitando los precursores del radical libre e inhiben otras reacciones de oxidación oxidándose ellos en su lugar (Martínez Vázquez, 2014)

Aunque las reacciones de oxidación son parte del metabolismo mismo y necesarias para la vida, también pueden causar efectos dañinos en el organismo, las plantas y los animales asimilan o producen sustancias o agentes reductores a través de complejos sistemas de múltiples tipos de antioxidantes, tales como glutatión, vitamina C, y vitamina E, así como enzimas tales como la catalasa y varias peroxidasas. Los niveles bajos de antioxidantes o la inhibición de las enzimas antioxidantes causan estrés oxidativo y pueden dañar o matar las células (Coronado, 2015)

Una paradoja en el metabolismo es que el oxígeno es primordial para vivir pero el mismo resulta dañino debido a su reactividad. Los organismos poseen una compleja red metabólica y enzimas antioxidantes que trabajan juntos para prevenir el daño oxidativo de los componentes celulares tales como el ADN, proteínas y lípidos. Generalmente los sistemas antioxidantes evitan que estas especies reactivas sean formadas o las eliminan antes de que puedan dañar los componentes vitales de la célula (Londoño, 2012)

Las variedad de moléculas reactivas derivadas del oxígeno que se pueden generar en las células incluyen el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el ácido hipocloroso ($HClO$), y radicales libres tales como el radical hidroxilo y el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), las moléculas con grupos funcionales oxidrilo son moléculas altamente inestable ya que son altamente reactivas por su inestabilidad, su capacidad de reaccionar rápidamente y su forma de reaccionar no específica con la mayoría de las moléculas biológicas. (Coronado, 2015)

Esta especie se produce del peróxido de hidrógeno en reacciones redox catalizadas por metales como la reacción de Fenton. Estos oxidantes pueden dañar las células comenzando reacciones químicas en cadena tales como la peroxidación de lípidos u oxidando el ADN o proteínas. Los daños al ADN pueden causar mutaciones y posiblemente cáncer si no son revertidos por los mecanismos de reparación del ADN, mientras que los daños a las proteínas causan la inhibición de enzimas, la desnaturalización y la degradación de proteínas (Coronado, 2015)

1.8. Función de los aceites esenciales

Se caracterizan por su capacidad antimicrobiana y sus mecanismos inespecíficos de acción puesto que tienen varios sitios de acción sobre las células y las reacciones pueden llevarse a cabo en forma independiente, simultánea o consecutivamente. (Martínez Vàsquez, 2014)

La membrana celular es un posible punto de acción donde los terpenoides surtirían efecto desencadenando una serie de procesos que podrían provocar la muerte bacteriana. El carácter hidrofóbico de los aceites esenciales les permite incorporarse en los lípidos de las membranas bacterianas y mitocondriales perturbando su estructura y consecuentemente su permeabilidad, dando lugar a la fuga de iones y otros contenidos celulares vitales, conduciendo finalmente a la muerte del microorganismo. Los aceites esenciales también podrían actuar sobre las proteínas embebidas en la membrana citoplasmática interfiriendo en la interacción lípido-proteína y afectando la actividad de enzimas como la ATPasa, disminuyendo la producción de energía requerida para el funcionamiento celular. Otra posible acción sería la interacción directa de los componentes lipofílicos con las partes hidrofóbicas de la molécula de proteína (Sepulveda, 2012)

1.9. Fracciones del aceite esencial de la cáscara naranja (*Citrus sinensis*)

1.9.1. Alfa-pineno

Es un elemento en estado líquido con las siguientes características: (ROTICHROM®, 2015)

- Líquido inflamable (grado 3)
- Corrosivo o irritante cutáneo (grado 2)
- Sensibilización cutánea (grado 1)
- Toxicidad por inhalación (grado 1)
- Peligroso para el medioambiente acuático - peligro agudo (grado 1)
- Peligroso para el medioambiente acuático - peligro crónico (grado 1)

Es inflamable tanto en estado líquido como en estado gaseoso puede ser mortal en caso de ingesta y en caso de penetración de las vías respiratorias provoca irritación cutánea puede provocar una irritación alérgica en la piel es muy tóxico para organismos acuáticos con efectos nocivos duraderos. (ROTICHROM®, 2015)

Propiedades físicas

Aspecto: líquido

Color: incoloro

Olor: característico

Densidad: 0.86 g/ml

Propiedades químicas

Punto de fusión/congelación: -64°C

Punto de ebullición: 155-156°C

Punto de inflamación: 32°C

Es un compuesto foto sensible sus vapores pueden formar mezclas explosivas existe riesgo de ignición su dosis letal 50 es de 3.700 mg/kg (ROTICHROM®, 2015)

1.9.2. Beta-pineno

Esta sustancia se la encuentra en esta liquido su fórmula molecular es C₁₀H₁₆ su peso molecular es 136.234 mg.

Nombre IUPAC: 6,6-Dimethyl-2-methylenebicyclo[3.1.1]heptane. (Ark Pharm, 2013)

La sustancia o mezcla de la misma está clasificada como:

- Tóxico por ingesta (grado 4)
- Irritación cutánea (grado 2)
- Irritabilidad al contacto los las mucosas de los ojos (grado 2)
- Tóxico para órganos específicos/por exposición individual (grado 3).
Daña las mucosas, al ingerir causa irritación en los ojos también en el sistema respiratorio y la piel. (Ark Pharm, 2013)

Propiedades físicas

Punto de ebullición: 166°C a 760 mm de Hg

Punto de fundición: -61°C

Soluble en agua (Ark Pharm, 2013)

1.9.3. Decanal

Esta sustancia se la encuentra en estado líquido, su fórmula molecular es C₁₀H₂₀O, su peso molecular es 156.265 mg.

La sustancia o mezcla de la misma está clasificada como:

- Toxico por ingesta (grado 4)
- Irritación cutánea (grado 2)
- Irritabilidad al contacto con las mucosas de los ojos (grado 2)

- Tóxico para órganos específicos/por exposición individual (grado 3).
Daña las mucosas, al ingerir causa irritación en los ojos también en el sistema respiratorio y la piel.

Propiedades físicas

Punto de ebullición: 209°C a 760 mm de Hg

Punto de fundición: 7°C

Soluble en agua (Ark Pharm, 2013).

1.9.4. D-Limoneno

Nombre Químico: Dipenteno, 1-metil-4-(1-metiletenil)-ciclohexano.

La sustancia o mezcla de la misma está clasificada como:

- Inflamable (grado2)
- Riesgo a la salud (grado1)
- Reactivo (grado 0) (Grupo transmerquim, 2014)

Tabla I

Propiedades físico-químicas D-Limoneno

| | |
|---|--|
| Aspecto Y Olor: | Líquido incoloro a amarillo pálido, olor cítrico |
| Punto de autoignición: | 458 ° F (237 ° C) |
| Punto de Ebullición: | 349 ° F (176 ° C) |
| Límites de inflamabilidad (explosivo) (% en volumen en el aire): | Inferior: 0.7 % Superior: 6.1% |
| Punto de inflamación: | > 110 ° F (43 ° C) |
| Índice de refracción: | 1,471 a 1,474 |
| Óptica de Rotación: | 96 ° a 104 ° |
| Punto de fusión: | -140 ° F (-96 ° C), se espesa en -108 ° F (-78 ° C) |
| Solubilidad (en agua): | Insoluble |

| | |
|---------------------------------|---------------------------------|
| Gravedad Específica: | 0,838 a 0,843 a 68 ° F (20 ° C) |
| Presión de Vapor: | <2 mmHg a 68 ° F (20 ° C) |
| Tasa de Evaporación (BuAc = 1): | 0,2 |

(Grupo transmerquim, 2014)

Propiedades toxicológicas

Efectos agudos: Se ha demostrado que tiene baja toxicidad oral (LD50> 5 g/kg) y baja toxicidad dérmica (LD50> 5g/kg) cuando se probó en conejos. También mostró una baja toxicidad por inhalación (RD50> 1 g/kg) cuando se probó en ratones. La capacidad de irritación cutánea del D-limoneno en cobayas y conejos se considera moderada y baja respectivamente. La inhalación puede causar irritación en la nariz, garganta y tracto respiratorio. (Grupo transmerquim, 2014)

Efectos crónicos: Este producto no está clasificado como carcinógeno por OSHA, IARC, ACGIH o NTP. Este producto no se ha demostrado que produzca cambios genéticos en pruebas en bacterianas o células animales. Este producto no contiene toxinas conocidas de reproducción o desarrollo. La exposición prolongada o repetida puede causar sequedad o dermatitis de la piel. El almacenamiento y la manipulación inadecuada pueden conducir a la sensibilización de la piel (Grupo transmerquim, 2014).

1.9.5. Linalool

Nombre químico: 3,7-Dimetil-1,6-octadien-3-ol

Formula: C10H18O

Efectos que puede tener sobre la salud:

Ojos: Irritación en los ojos

Piel: Irritación en la piel

Ingesta: Irritación de tracto digestivo, causa dolor al ingerirlo

Inhalación: irrita las vías respiratorias, causa dolor al inhalarlo

Crónico: su exposición puede causar problemas en el sistema central nervioso

Propiedades físicas

Estado físico: líquido

Aspecto: incoloro-amarillo pálido

Olor: característico

Viscosidad: 4.4 mPa

Punto de ebullición: 199°C

Densidad: 0.861

Peso molecular: 154.25mg (Acros Organics, 2008).

1.9.6. Mirceno

Formula: C₁₀H₁₆

Peso molecular: 136.24 g/mol

Es un compuesto foto sensible que al mezclarse con otros compuestos puede ser explosivo.

Dosis letal 50 es de 5.000 mg/kg en ratas.

Propiedades físicas

Forma: líquida

Color: transparente

Olor: característico

pH: 7

Punto de ebullición: 167°C

Densidad: 0.80 g/ml (Merk-chemicals, 2010)

1.9.7. Octanal

Nombre químico: 1-Octanal, fórmula: C₈H₁₆O, el octanal es inflamable también irritante para las mucosas respiratorias y gástricas además de ser irritante a la piel, su dosis letal 50 3730 mg/kg en ratas.

- Líquido inflamable (grado 2)
- Daño a la salud (grado 2)
- reactivo (grado 0)

Propiedades físicas

Apariencia: líquido

Olor: a fruta

Color: amarillo pálido

Peso molecular: 128.22 g/mol

Punto de ebullición: 163.4°C

Punto de fundición: -23°C

Densidad: 0.821

Soluble: agua, cetona y dietil éter (Sciencelab, Inc., 2013)

1.9.8. Sabineno

El sabineno es inflamable también irritante para las mucosas respiratorias y gástricas además de ser irritante a la piel.

Fórmula: C₁₀H₁₆

Estado físico: líquido

Punto de ebullición 163°C

Flamable (grado 3) (Lyon, 2016)

1.10. Flavonoides

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la contaminación ambiental, sustancias químicas presentes en los

alimentos, etc. El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. (Rangel, 2010)

Están ampliamente distribuidos en plantas, frutas, verduras y en diversas bebidas y representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana. Estos compuestos fueron descubiertos por el premio Nobel Szent-György, quien en 1930 aisló de la cáscara del limón una sustancia, la citrina, que regulaba la permeabilidad de los capilares. Los flavonoides se denominaron en un principio vitamina P (por permeabilidad) y también vitamina C (porque se comprobó que algunos flavonoides tenían propiedades similares a la vitamina C). (Rangel, 2010)

Sin embargo, el hecho de que los flavonoides fueran vitaminas no pudo ser confirmado, y ambas denominaciones se abandonaron alrededor de 1950. Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante (Coronado, 2015)

1.10.1. Clasificación de los flavonoides

1. Flavanos, como la catequina, con un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
2. Flavonoles, representados por la quercitina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
3. Flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.

4. Antocianidinas, que tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C (Rangel, 2010)

1.11. Técnicas de extracción de aceites esenciales

- Destilación por arrastre de vapor:

El método de destilación por arrastre de vapor es el más usado debido a los bajos costos y la variedad de solventes que se pueden emplear, por ejemplo, se puede destilar usando agua, metanol, etanol, éter, hexano, etc. Este método se fundamenta en la presión que ejerce el solvente en forma de vapor hirviendo y arranca como vapor las sustancias y permite que se volatilicen sustancias con punto de ebullición alto ya que el proceso dura un amplio intervalo de tiempo parte de las sustancias volátiles se pierden en el proceso de destilación debido a que son elementos volátiles. Además, ocurren varios procesos químicos que podría degradarse la sustancia a extraer debido a una hidrólisis u oxidación (Franco, 2015)

- Enfleurage:

Las flores se ponen en contacto con un aceite vegetal de punto de fusión alrededor de 40 °C, que actúa como vehículo arrastrando el extracto, se dispersa la muestra vegetal en una bandeja de profundidad no mayor de 0.5 cm. Este proceso puede durar de 3 a 5 días luego se debe renovar la materia prima hasta saturar el solvente, luego se procede a la separación de los residuos sólidos y del extracto de aceites esenciales. Finalmente, se separa el aceite esencial del solvente con alcohol y luego se lo aísla mediante filtración al vacío recuperando al menos 80% del alcohol (Sepulveda, 2012)

- Extracción con solventes

La materia prima es molida previo a la extracción para que tenga una mayor área de contacto con el solvente, el proceso se realizara en condiciones normales pero con agitación constante en este proceso el solvente solubilizara el aceite. Los solventes más empleados son: etanol, metanol, isopropanol, hexano, ciclohexano, tolueno, xileno, ligroina, éter etílico, éter isopropílico, acetato de etilo, acetona, cloroformo, finalmente se recuperan por destilación y pueden ser reutilizados (Martínez Vásquez, 2014)

- Extracción por prensa

La muestra es expuesta a presión, empleando prensas tipo batch o en forma continua. Existen varios tipos de prensas entre ellas tenemos los siguientes equipos tornillo sin fin de alta o de baja presión, extractor expeller, extractor centrífugo, extractor decanter y rodillos de prensa. En estos procesos la mezcla de agua-aceite se centrifuga a 5000 rpm durante 40 minutos y el aceite esencial recuperado se coloca a 3 °C durante 4 horas, para solidificar gomas y ceras que localizan en la superficie (Sepúlveda, 2012).

- Extracción con fluidos supercríticos

La extracción con fluidos supercríticos aprovecha el poder de disolución de los fluidos, en condiciones por encima de su temperatura y presión críticas. Es posible obtener extractos sin disolventes y la extracción es más rápida que cuando se utilizan disolventes orgánicos convencionales. Las propiedades de la fase líquida y/o vapor son las mismas, es decir no hay diferencia visible ni medible entre gas y líquido. La sustancia más empleada es el CO₂ que en estas condiciones presenta baja viscosidad, baja tensión superficial, alto coeficiente de difusión (10 veces más que un líquido normal). El material vegetal cortado en trozos pequeños, licuado o molido, se empaca en una cámara, el líquido supercrítico al penetrar a la muestra, solubiliza los aceites que son arrastrados, el solvente extractor (líquido supercrítico) se elimina totalmente por

descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente (Sepulveda, 2012)

1.12. Tipos de extractos según su consistencia

Tabla II Clasificación de extractos según sus aspectos

| Blandos | Firmes | Secos | Fluidos |
|--|---|---|---|
| Su consistencia varia debido a la humedad relativa del medio en al que este se esponga pero en general su densidad va ser muy similar a la de la miel. | Estos extractos se parecen bastante a la masa con la que se fabrican las píldoras estos extractos se caracterizan por no ser adhesivos lo cual les atribuye una fácil manipulación. | Son también conocidos como sales esenciales estos son casi polvo por lo que son fáciles de manipular a estos extractos se les ha removido casi todo el solvente dejando al aceite esencial tan solo con un aproximado de entre 6 a 8 % de solvente. | Estos extractos son desecados al aire y pulverizados, el peso de estos extractos corresponden en su totalidad a la sustancia esto quiere decir que se ha aislado completamente del solvente |

(Martínez Vázquez, 2014).

1.13. Métodos para determinar actividad anti oxidante

Los métodos predilectos son (DPPH y ABTS)

1.13.1. El método de 2,2-Diphenyl-1-picrilhydrazyl (DPPH)

Es un radical libre que puede ser extraído fácilmente sin necesidad de preparación previa de la muestra mientras que el ABTS necesita ser inducido por una reacción que puede ser química (dióxido de magnesio, persulfato de potasio también puede ser una reacción enzimática (peroxidasa, mioglobulina) o una reacción electro química (Osorio, 2015)

1.13.2. Método: Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS)

Tiene la capacidad de determinar el grado de actividad de los compuestos de carácter lipofílicos e hidrofílicos, mientras que el DPPH solo puede disolverse en un medio orgánico y el DMPD en un medio acuoso. El radical ABTS tiene la ventaja de que su espectro de absorbancia máximo es de 414nm a 815nm mientras que el DPPH es de 515 nm (Research, 2015)

1.14. Propiedades físicas y químicas

1.14.1. Densidad

Se define como masa por unidad de volumen, para un fluido homogéneo la densidad no varía, la densidad se la puede obtener empleando un picnómetro, se pesa el picnómetro vacío se pesa el picnómetro con agua y se pesa el picnómetro con el fluido que se desea analizar y se divide la masa de la muestra para la masa del agua luego se multiplica por la densidad del agua y se obtiene la densidad de la sustancia a analizar (Martínez, 2014)

1.14.2. Índice de refracción

El índice de refracción de un líquido es una magnitud física que determina la proporción del cambio de dirección de un rayo de luz al cambiar el medio en el

que se mueve, específicamente cuando entra en contacto con un líquido. Para el caso de los aceites esenciales, el índice de refracción es un parámetro propio de cada aceite esencial, y por lo tanto, si un aceite es mezclado con diluyentes u otras sustancias, su índice de refracción cambia, por lo cual este es un parámetro que sirve para determinar la pureza de un aceite esencial. El procedimiento de cálculo puede realizarse mediante la utilización de un refractómetro, que es un dispositivo electrónico que permite medir la velocidad de propagación de la luz en un medio (Franco, 2015).

1.14.3. pH (Potencial de Hidrógeno)

El **pH** puede definirse como una medida que expresa el grado de acidez o basicidad de una solución en una escala que varía entre 0 y 14. La acidez aumenta cuando el pH disminuye. Una solución con un pH menor a 7 se dice que es ácida, mientras que si es mayor a 7 se clasifica como básica. Una solución con pH 7 será neutra. El valor de pH representa el menos logaritmo en base diez de la concentración (actividad) de iones hidrógeno $[H^+]$. Como la escala es logarítmica, la caída en una unidad de pH es equivalente a un aumento de 10 veces en la concentración de H^+ . Entonces, una muestra de agua con un pH de 5 tiene 10 veces más H^+ que una de pH 6 y 100 veces más que una de pH 7 (Plaza, 2015)

1.14.4. Solubilidad

La solubilidad de un soluto en un disolvente es la concentración que presenta una disolución saturada, o sea, que está en equilibrio con el soluto sin disolver porque siempre habrá algunas moléculas o iones que pasen a la disolución. Las sustancias se clasifican en: Solubles: si su solubilidad es 0,1 M o >. Poco Solubles: si su solubilidad se sitúa entre 0,1 M y 0,001 M Insolubles: si su solubilidad no llega a 0,001 M (Martínez, 2014)

1.15. Cromatografía de gases

La cromatografía agrupa a un conjunto de métodos analíticos que permiten al investigador separar e incluso en algunos casos identificar los componentes presentes en mezclas complejas. En toda separación cromatográfica intervienen dos fases, una móvil y otra estacionaria. La fase móvil actúa como disolvente y vehiculiza el paso de la muestra a analizar a través de la fase estacionaria, que ha de ser inmisible, y normalmente se ubica en una columna o un soporte sólido (Soto, 2012)

La cromatografía de gases es una técnica de separación en la que una fase gaseosa (fase estacionaria) atraviesa una columna con una fase líquida (fase móvil). Se coloca a la entrada de la columna la sustancia que se desea analizar de manera que los gases sean capaces de arrastrarla hasta la fase líquida, luego dependerá de los coeficientes de reparto el tiempo que estas sustancias se mantengan en la fase líquida o estacionaria, provocando la separación de los compuestos debido a su diferencia en el tiempo de retención, a la salida se detecta por medio de un detector los compuestos. (Osorio, 2015)

En cromatografía de gas se volatiliza y se inyecta en la cabeza de la columna cromatográfica luego la elución se da por el flujo de la fase móvil de gas inerte, el gas no va a interactuar con la muestra, su única función será transportar la muestra a través de la columna cromatográfica. En este punto se dará la separación de los componentes de la mezcla los cuales finalmente son identificados por el detector el cual registrará las lecturas correspondientes a los analitos que componen la muestra (Christian, 2009)

1.15.1. Existen dos tipos de cromatografía de gases:

Hay dos tipos de cromatografía de gases: a) cromatografía de gas-sólido de adsorción y b) cromatografía gas-líquido de partición.

La naturaleza de la muestra ya sea sólida o líquida influenciará en el equilibrio de intercambio con los componentes de la muestra según su adsorbibilidad o solubilidad. La muestra se detecta automáticamente cuando sale de la columna (a un flujo constante) mediante diversos detectores cuya respuesta depende de la composición del vapor. En general, el detector tiene una sección de referencia y una sección de muestreo. El gas acarreador pasa por la sección de referencia antes de entrar a la columna y sale de la columna por la sección de muestreo. La respuesta de la sección de muestreo en relación con la señal en la sección de referencia se alimenta a un registrador donde se grafican los máximos cromatográficos en función del tiempo, al medir el tiempo de retención (los minutos entre el momento de inyectar la muestra y el momento en que se registra el máximo cromatográfico) y comparar esta vez con el de un estándar de la sustancia pura se puede identificar el máximo (la coincidencia en los tiempos de retención de dos compuestos no garantiza que éstos sean idénticos) .

El área bajo el máximo es proporcional a la concentración, por lo que se puede determinar en forma cuantitativa la cantidad de sustancia, con frecuencia los máximos son muy agudos, y en ese caso se puede comparar la altura del máximo con una curva de calibración preparada de la misma manera. En general, los sistemas de detección en cromatografía poseen una lectura automática del área del máximo y también del tiempo de retención (Dozal, 2010)

1.16. Divisor de flujo o Split

Situado al final de la cámara de mezcla, es un sistema también conocido como "Split" que permite, como su propio nombre indica, dividir el flujo de gas

portador mezclado con la muestra vaporizada en dos fracciones, una entra directamente en cabeza de columna y la otra se expulsa hacia el exterior mediante una válvula de aguja que regula la cantidad de muestra que entra en columna. De esta forma cuando indicamos en el método cromatográfico que se aplica un Split 100:1, estamos introduciendo una parte de la mezcla en columna y enviamos a la atmósfera el 99 restante, mediante este sistema se pierde bastante sensibilidad y lógicamente no pueden analizarse componentes presentes a muy baja concentración. En estos casos se acude al sistema de inyección sin división de flujo, "splitless" (Navarro, 2015).

1.17. Columnas cromatográficas

En cromatografía de gases se emplean dos tipos de columnas, las empaquetadas y las capilares. Por capacidad resolutive, en la actualidad las columnas capilares han sustituido casi en su totalidad a las empacadas o de relleno. Las principales diferencias entre ambos tipos de columna son el grosor y la longitud. Las columnas empaquetadas, normalmente de vidrio o acero, tienen un diámetro interno que varía entre 2 y 5 mm y una longitud comprendida entre 1 y 15 m. Sin embargo las capilares de forma generalizada, están fabricadas con vidrio o sílice fundida y presentan un diámetro interno entre 0,2 y 0,8 mm y una longitud de 20-50m (Navarro, 2015)

1.18. Cromatografía de gases-espectrometría de masas

La aparición de un máximo cromatográfico a determinado tiempo de retención sugiere, pero no garantiza, la presencia de determinado compuesto. La probabilidad de que la identificación sea positiva depende de factores como el tipo y la complejidad de la muestra y de los procedimientos de preparación de muestra que se empleen. (Dozal, 2010)

Un cromatograma de gases de una muestra de sangre diluida con una solución de un estándar interno (para verificar el tiempo de retención y el área relativa del máximo) que produce un máximo grande en el lugar esperado para el

alcohol sugiere fuertemente la presencia de alcohol en la sangre, dado que hay pocos compuestos no tóxicos que podrían interferir. Sin embargo, puede suceder que el aspecto de un máximo de cocaína en cromatografía de gases no sea tan directa para confirmar la presencia de esta droga; en este caso se suelen buscar pruebas de confirmación, de aquí que se deba recurrir a la información espectral como la espectrometría infrarroja o la ultravioleta. Un método muy poderoso es la combinación de cromatografía de gases con la espectrometría de masas, y la técnica se llama cromatografía de gases-espectrometría de masas (gases-masas). Los sistemas gases-masas solían llenar un recinto y costar varios cientos de miles de dólares; hoy se dispone de sistemas compactos, de escritorio, relativamente poco costosos, y se usan mucho en los laboratorios. (Constansa, 2015)

Se muestra un moderno instrumento de gases-masas. Primero se describirán los principios de los espectrómetros de masas y los tipos de instrumentos, y a continuación se dirá cómo se usan juntas las técnicas de cromatografía de gases y espectrometría de masas (Christian, 2009)

1.19. Principios de espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una técnica instrumental sofisticada que se emplea para separar y detectar iones en fase gaseosa; las partes básicas de un espectrómetro de masas se muestran en la muestra con una presión de vapor moderadamente alta se introduce en un sistema de admisión, que trabaja a un vacío de 10^{-4} a 10^{-7} torr y a alta temperatura, hasta 300°C . Los compuestos no volátiles se pueden evaporar mediante una chispa u otra fuente, las moléculas del analito suelen ser neutras y se deben ionizar, lo que se logra con varios métodos, aunque lo habitual es bombardearla con electrones de alta energía en una fuente de impacto electrónico (Constansa, 2015).

1.20. Atomización de la muestra

Existen dos tipos de atomizaciones la continua y la discreta, en la atomización continua se ingresa la muestra al atomizador a una velocidad constante de manera que la señal espectral también será constante, en cuanto a los atomizadores discretos la cantidad de muestra será medida y se introducirá como un bolo ya sea la muestra líquida o sólida, la señal espectral en este caso alcanzará su valor máximo y luego llegara a cero cuando el vapor atómico logre abandonar la región calentada (Skoog, 2008)

1.21. Analizadores de masa

Los detectores de espectro de masas se fundamentan en el uso de campos magnéticos, este sistema se aplica en química orgánica para determinar la composición de diferentes sustancias, estos deflectan los iones dentro de un tubo curvo en un campo magnético con base en sus energías cinéticas, que a su vez están determinadas por su masa, carga y velocidad. El campo magnético se barre para medir diferentes iones. Este separador de masas es muy poderoso y posee una muy alta resolución; sin embargo, los instrumentos son bastante grandes y costosos (Christian, 2009)

1.22. Filtro de masas cuadrupolar

El analizador de masas cuadrupolar es un “filtro de masas” que sólo permite el paso de iones específicos. El analizador de cuadrupolos consiste en cuatro varillas metálicas paralelas a las que se aplica al mismo tiempo un voltaje de cd (U) y un voltaje oscilante de radiofrecuencia ($V \cos wt$, donde w es la frecuencia y t el tiempo). Dos polos opuestos se cargan de modo positivo y los otros dos en forma negativa, y sus polaridades cambian durante el experimento. Los voltajes aplicados son $U + V \cos wt$ y $-(U + V \cos wt)$ (Skoog, 2008).

Estos voltajes determinan la trayectoria de los iones mediante la trayectoria de vuelo entre los cuatro polos. Cuando los iones procedentes de la fuente de ionización entran al campo de radiofrecuencia a lo largo del eje z de

los electrodos, oscilan con respecto a ese. El analizador cuadripolar tiene varias ventajas que lo hacen ideal para gases-masas La trayectoria no depende de la energía cinética (es decir, de la velocidad) ni de la deflexión angular de los iones que entran; entonces, la rapidez de transmisión es alta. Como sólo se requiere un cambio de voltaje, un barrido completo puede ser muy rápido (Christian, 2009).

Se pueden registrar hasta ocho espectros por segundo sobre un intervalo aproximado de 800 unidades de masa. Se necesita un barrido rápido para monitorear los máximos de cromatografía que pueden tener una fracción de segundo de ancho. Se puede alcanzar una resolución de unos 1 500, y los sistemas de cromatografía de gases suelen proporcionar resolución unitaria. Por último, los instrumentos cuadripolares son relativamente compactos y poco costosos. (Skoog, 2008).

Capítulo II

Materiales y Métodos

2. Tipo de estudio

El presente trabajo se realizó mediante un estudio bibliográfico descriptivo experimental.

2.2. Selección de la materia prima

En este proceso se empleara naranjas cuyo grado de maduración sea grado 3; el grado 3 es una tonalidad amarilla característica de la naranja que indica un nivel intermedio de maduración, estas naranjas se seleccionaron en un mercado al aire libre de Guayaquil. (Martinez Vàsquez, 2014)

2.2.1. Tratamiento de la materia prima

Antes de extraer los aceites esenciales se preparó la muestra con los siguientes pasos:

- Lavado de la fruta
- Pelado de la fruta
- Pesado de la cáscara
- Troceado de la cáscara
- Remojo de la cáscara en agua 2 horas (preferiblemente)

2.3. Extracción del aceite esencial de la naranja

Se obtendrá el aceite esencial de la naranja a través del método de destilación por arrastre de vapor, empleando el vapor de agua para extraer el aceite esencial de las cascaras de naranja (*citrus sinensis*), esto dará como resultado una emulsión que se la separará empleando el método físico de decantación. Previo a la extracción se pesa las cáscaras de naranja para un posterior cálculo de rendimiento para determinar cuántos gramos de muestra se

necesitan para obtener una cantidad de extracto de aceite esencial. (Franco, 2015)

2.4. Extracción por arrastre de vapor

En el primer balón del sistema se pondrá el disolvente (agua) que se llevará a 100°C para que el vapor de agua migre al segundo balón donde se encuentra la cáscara de naranja troceada, con el fin de que el agua al ser un solvente polar arrastre los aceites esenciales sin mezclarse con ellos esto se debe a que provoca que los aceites esenciales alcancen su punto de ebullición por medio de convección, las vesículas presentes en los retazos de cáscara de naranja son bombardeadas por ráfagas de vapor de agua caliente a una presión constante llevando sus aceites esenciales hacía el refrigerante, este vapor se condensará en el refrigerante precipitando como una suspensión con los aceites esenciales en una fiola, que estará al final del sistema esperando para su recolección. Los ciclos de destilación duran alrededor de 40 minutos, el aceite esencial se extrajo a 105°C aproximadamente. Se realizó varios ciclos hasta alcanzar un volumen de 60 ml. Esta cantidad de aceite esencial se utilizó para realizar diferentes ensayos que ayudaron a determinar las propiedades físico-químicas del aceite esencial de la cáscara de naranja dulce (*Citrus sinensis*). (Aguilera, 2015)

2.5. Decantación

En este paso se va aislar el aceite esencial del agua por diferencia de densidades empleando una ampolla de decantación. Además, debido a la inmiscibilidad del solvente en el extracto será más fácil de aislar, a continuación se deberá conservar el extracto en un frasco ámbar debido a que es un producto foto sensible. (Aguilera, 2015)

2.6. Cálculo del rendimiento

Se divide el volumen obtenido de aceite esencial para el peso de la materia prima usada en cada ciclo de la extracción y se multiplica por la densidad para expresar el volumen obtenido en peso de materia prima. (Martínez, 2014)

2.7. Prueba para evaluar la capacidad antioxidante del extracto

Se determinará la acción antioxidante a través del método DPPH. El radical difenilo 2,2-difenil-1-picril-hidracil (DPPH) posee una coloración morada cuando encuentra el radical libre (-H) con el cual al complementarse pierde la coloración morada; el cambio de coloración es lo que permite cuantificar la actividad anti oxidante. (Research, 2015)

Técnica

Se prepara el radical difenilo 2,2-difenil-1-picril-hidracil a una concentración de 60 μM en una solución metanólica y se realizó la lectura de su respectiva absorbancia a 545 nm de longitud de onda. El blanco será una solución de metanol y el control será una solución de (DPPH-metanol) (Tovar, 2013)

El ensayo se realizó empleando 197 μL de la solución control y 7 μL de la muestra a analizar se dejó la solución muestra tapada en un recipiente con aluminio en la oscuridad por al menos 30 min, luego se leerá su absorbancia, la cual será inferior a la de la solución control debido a que la muestra ha neutralizado los radicales libres del DPPH. (Tovar, 2013)

Fórmula para calcular la actividad anti oxidante:

$$AA = \frac{(Ab\ c - A\ m)}{Ab\ c} \times 100$$

Ab c = absorbancia control

Am = absorbancia muestra

AA = actividad antioxidante

2.8. Determinación de la composición del aceite esencial por cromatografía de gas

La muestra de aceite esencial fue diluida 900:100 en éter di etílico: muestra se usó 1 µl de esta solución, para el análisis se inyectó empleando un inyector Split, en una proporción 10:1 a 250°C. El análisis se realizó en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectro de masa, empleando una columna con una fase estacionaria de 5% fenil y 95% polisiloxanos; esta fase estacionaria es de carácter no polar (30 m x 0.250 mm ID x 0.25 µm DB-5MS marca (Agilent). (Yáñez, 2005)

Se usó helio como gas portador a una presión de 9.43 psi, el horno fue programado para iniciar con una temperatura de 60°C por un minuto, se programó un incremento de temperatura de 2°C por min, hasta llegar a 240°C, La detección fue en modo scan de (40-400 amu). (Navarro, 2015)

Una vez separados los diferentes compuestos del aceite esencial pasan al espectrómetro de masa para su ionización donde se fragmentaran en sus respectivos iones, estos iones serán separados por tamaño y tipo de carga

empleando un cuadrupolo cargado positiva y negativamente ejerciendo un campo magnético por el cual se filtraran los iones por su afinidad de carga, el espectrómetro de masas generará una señal que luego será captada por el detector, esta señal se compara con una lectura estándar del compuesto hallado para corroborar la presencia de dicho compuesto y su pureza dependiendo del número de coincidencias hallado entre la lectura y el estándar. (Skoog, 2008)

La asignación de las estructuras se efectuó por comparación de los espectros de masas de los compuestos con los de la bibliotecas del equipo: Wiley 9na edición y nist-2011, seleccionando aquellos con más de un 90% de confiabilidad.

2.9. Propiedades físicas

2.9.1. Densidad

Relaciona la masa de un objeto con el volumen que ocupa. En el sistema internacional de medidas, la unidad utilizada para cuantificar la densidad es kg/m^3 . Se calculó usando un picnómetro se lo peso vacío, luego con aceite esencial y por diferencia de pesos se obtuvo el peso de la masa que posee el aceite esencial, este valor se lo divide para el volumen del picnómetro. (Martínez, 2014)

2.9.2. Índice de refracción

Se coloca una gota de la muestra que se desea medir en el prisma principal y se cierra la cubierta. Una sola gota es todo lo que se necesita para obtener una lectura. Hay que asegurarse de que la gota sea fresca. Las lecturas deben realizarse rápidamente para evitar la evaporación, que puede distorsionar los resultados. Se mira a través del ocular y se ajusta la luz para que la línea

entre la zona oscura y la de luz esté enfocada. Una vez que esta línea se alinea con la escala, registra la lectura y se toma nota de la temperatura. (Franco, 2015)

2.9.3. pH

Para esta determinación se usaran tirillas de pH, y se compara con la respectiva cartilla de escalas colorimétrica que indican el pH correspondiente, esta cartilla viene con las tirillas. (Plaza, 2015)

2.9.4. Solubilidad

Se empleará un ml de aceite esencial el cual será titulado en agitación constante frente a diez ml de diferentes solventes entre ellos (éter etílico, metanol, etanol, alcohol cetona y agua) estos solventes se los empleará en concentraciones de 100%, 90% y 80%, luego se elaborará una tabla con los volúmenes empleados para solubilizar el extracto. (Martínez, 2014)

CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. Rendimiento

Empleando el método de Arrastre de Vapor se puede extraer una determinada cantidad de aceite esencial por cada ciclo de extracción en los cuales se empleó Aproximadamente 300g de cáscara de naranja por ciclo de extracción.

Rendimiento= multiplicando el volumen obtenido en cada extracción por la densidad con el fin de expresar lo en gramos para poder obtener el rendimiento por regla de tres comparándolo con el peso de la muestra empleada.

$$\text{rendimiento} = \frac{\text{gramos aceite obtenido} \times 100}{\text{gramos de muestra}} = \%$$

Tabla III

Rendimiento de la muestra PROMEDIO DEL RENDIMIENTO = 2.59%

| Peso de la materia prima | Volumen obtenido | Gramos del aceite obtenido | Rendimiento % | X-U | X-U ² |
|--------------------------|------------------|----------------------------|---------------|------|------------------|
| 300 g | 1.2 ml | 1.0308 g | 3.09% | 0.5 | 0.25 |
| 320 g | 1.2 ml | 1.0308 g | 3.29% | 0.7 | 0.49 |
| 240 g | 0.8 ml | 0.687 g | 1.64% | 0.95 | 0.9025 |
| 260 g | 0.8 ml | 0.687 g | 1.78% | 0.81 | 0.6561 |
| 310 g | 1.2 ml | 1.0308 g | 3.19% | 0.6 | 0.36 |
| 280 g | 1 m | 0.859 g | 2.40% | 0.19 | 0.0361 |
| 313 g | 1.2 ml | 1.0308 g | 3.22% | 0.63 | 0.3969 |

| | | | | | |
|-------|------|---------|-------|------|--------|
| 250 g | 1 ml | 0.859 g | 2.14% | 0.45 | 0.2025 |
|-------|------|---------|-------|------|--------|

Fuente: Eduardo Meza Ipanaqué.- 2016

DESVIACION ESTANDAR =0.27%

Durante los ciclos de extracción realizados se obtuvo tan solo 1.2 ml debido al remojo de las cáscaras de naranja durante un lapso de 30 minutos; mientras que los autores Martínez, 2014 & Pizarro, 2015 que realizaron estudios similares a este sugerían el remojo de las cáscaras por un lapso de 2 horas con el fin de humectar la cáscara y que las vesículas que almacenan el aceite esencial en las cáscaras puedan soltar la mayor cantidad de aceite posible; también sugieren la molienda de la cáscara para romper las vesículas que almacenan el aceite esencial. Debido a la limitación de no contar con un molino se procede trocear las cáscaras manualmente hasta dejar los trozos de cascara lo más pequeños posibles.

La implementación de la molienda de las cáscaras y el remojo por un lapso de 2 horas contribuyó a que lograran obtener de 2 a 2.2 ml de aceite esencial por ciclo de extracción duplicando el rendimiento que se obtuvo en la extracción realizada en el presente estudio.

3.2. Determinación del índice de refracción

El índice de refracción obtenido fue de 1.4707 a una temperatura de 21.9°C en un refractómetro marca Atago, en este ensayo se toma en cuenta las condiciones climáticas debido a que pueden incidir sobre el resultado.

Este resultado se comparó con las fichas técnicas que se emplean para la selección de materia prima en la empresa Calbaq y con el certificado de

calidad de Lucta para confirmar que el aceite esencial obtenido en este estudio está dentro de parámetros aceptables (1,4750-20.0°C / 1.4666-30.0°C); el resultado puede variar dependiendo de la temperatura bajo la que se somete el análisis. (Franco, 2015) Y (Martínez, 2014)

3.3. Determinación de la densidad

La densidad se determinó pesando en una balanza analítica un picnómetro de 25 ml vacío, y luego se lo pesó lleno por diferencia se obtuvo el peso del aceite esencial de la naranja. Luego, empleando la fórmula densidad es igual a masa sobre volumen se logró determinar la densidad del aceite esencial.

Peso del Picnómetro vacío = 17.932 g

Peso del Picnómetro lleno de aceite esencial = 39.409 g

Volumen del picnómetro= 25 ml

$$\text{Densidad} = \frac{\text{picnómetro lleno} - \text{picnómetro vacío}}{\text{volumen del picnómetro}}$$

$$\text{Densidad} = \frac{39.409 \text{ g} - 17.932 \text{ g}}{25 \text{ ml}} = 0.859 \text{ g/ml}$$

3.4. Análisis organoléptico

El aceite esencial obtenido de las cáscaras de naranja dulce (citrus sinencis) presentó un aroma dulce ligeramente ácido, incoloro con un aspecto transparente, oleoso al tacto.

Tabla IV

Propiedades físicas del extracto obtenido en el presente trabajo de investigación

| | |
|---------|-------------------------|
| Color | Blanco lechoso |
| Aspecto | Transparente |
| Olor | Dulce ligeramente ácido |

| | |
|----------------------------------|----------------------|
| Densidad | 0.859 g/ml |
| Índice de refracción | 1.4707 |
| pH | 6.4 |
| Solubilidad en agua | Insoluble totalmente |
| Solubilidad en cetona 50% | Soluble totalmente |
| Solubilidad en éter etílico 100% | Soluble totalmente |
| Solubilidad en metanol 100% | Parcial (1 en 7) |

Fuente: Eduardo Meza Ipanaqué.- 2016

3.5. Ensayo de solubilidad

En un vaso de precipitación se colocó un ml de aceite esencial de (citrus sinensis), al cual se le agrego un solvente conocido a manera de titulación de ml en ml para demostrar su grado de solubilidad con los diferentes solventes, el ensayo toma como consumo máximo hasta 9 ml de solvente, pasado el consumo máximo se considerará inmiscible y se le asignará N/A al consumo debido a que el volumen que se asignará en la tabla será solo para los que logren mezclarse con la muestra.

Tabla V

Solubilidad del aceite esencial del extracto obtenido en el presente trabajo de investigación

| Solvente | Consumo | Resultado |
|-------------------|---------|----------------------|
| Agua | N/A | Insoluble |
| Cetona 50% | 1ml | Soluble |
| Éter etílico 100% | 1 ml | Soluble |
| Metanol 100% | 7 ml | Parcialmente soluble |

Fuente: Eduardo Meza Ipanaqué.- 2016

3.6. Evaluación de capacidad anti oxidante por captación de radicales libre método de (DPPH)

La capacidad de captación de radicales libres del aceite esencial de la cáscara de la naranja dulce (*citrus sinensis*) frente al radical difenilo (2,2-difenil-1-picril-hidracil) se calculó por diferencia de absorbancia entre el estándar y la muestra dando un 4.5% de actividad antioxidante.

El bajo % de AA del aceite esencial de la cascara de naranja (*citrus sinensis*) se debe a que el limoneno no tiene capacidades antioxidantes, pero los otros compuestos que también forman parte del aceite esencial si lo son; el porcentaje bajo se debe a que el compuesto predominante en el aceite esencial de la naranja es el limoneno y sus acompañantes se presentan en trazas.

Este parámetro fue evaluado para determinar su uso como materia prima como conservante alimenticio; a pesar de no tener las cualidades como preservante grado alimenticio el limoneno grado alimenticio se lo emplea como edulcorante en gomas de mascar y en la industria de confitería. (Osorio, 2015)

Martínez (2014) realizó un estudio con extractos etanólicos, metanólicos y acuosos del aceite esencial de la (*citrus sinensis*) y determinó captación de radicales libres por DPPH de 2% hasta 15%.

3.7. Análisis cromatográfico del aceite esencial de la naranja dulce (citrus sinensis).

Tabla IV Caracterización de compuestos del extracto obtenido

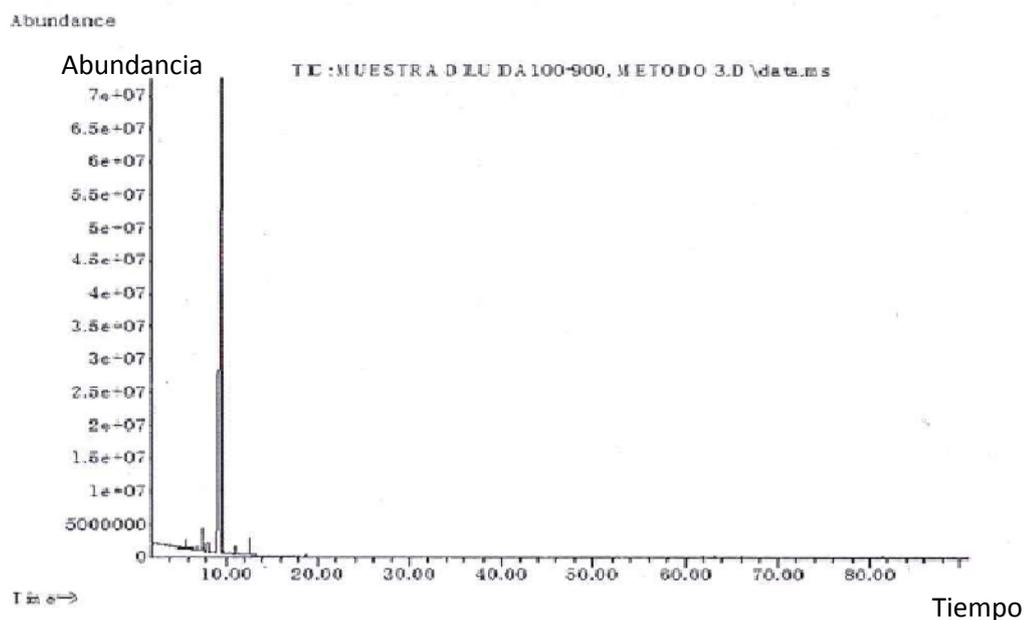
| Pico | Tiempo de retención por minuto | Compuesto | % del área |
|------|-----------------------------------|-------------------------------------|------------|
| 1 | 7.550 | B-Mircene | 1.20 |
| 2 | 9.690 | D-Limoneno | 96.73 |
| 3 | 12.697 | 3-Carene | 0.74 |
| 4 | N/A | Otros elementos sin caracterizar | 1.33 |

Fuente: Eduardo Meza Ipanaqué.- 2016

Los tiempos de retención fueron de 7.5 min para el B-Myrcene, 9.69 min para el D-Limoneno y 12.69 min 3-Carene.

Grafico I

Cromatograma analítico gaseoso aceite esencial de naranja



Fuente: Eduardo Meza Ipanaqué.- 2016

La lectura del equipo mostró que el limoneno se encontraba predominante en el aceite esencial, el cual conforma el 97% dado por el % de área del aceite esencial con un tiempo de retención de 9.690 min.

German (2012) reporta la presencia de hasta 14 compuestos diferentes Presentes en el aceite esencial es posible que los otros componentes de la muestra se hallan volatilizado debido a la naturaleza de los mismos y la alta foto sensibilidad del extracto, sin embargo todos los estudios consultados reportan un mínimo del 90% de limoneno hasta un máximo de 98% mientras que las demás fracciones acompañantes se encuentran en trazas.

3.8. Caracterización de componentes en aceites esenciales por diferentes autores

Tabla VII

Caracterización de los compuestos

| Compuesto | Tiempo de retención | % correspondiente a la fracción |
|----------------------|---------------------|---------------------------------|
| Isocitroneleno | 16.96 min | 0.43% |
| Cafeno | 19.00 min | 1.62% |
| Trans-P-mentano | 19.82 min | 1.66% |
| P-menta-1.7.8-dieno | 20.42 min | 0.69% |
| D-limoneno | 21.95 min | 90.93% |
| Dihidromircenol | 23.74 min | 0.45% |
| Trans-dihidrocarvona | 25.21 min | 1.78% |

(Yáñez, 2005).

Yañez (2005) identificó 7 fracciones presentes en el aceite esencial de la cáscara de naranja dulce (*Citrus sinensis*) de las cuales tan solo 4 fracciones superaban el 1%, de estas solo el D-limoneno constaba de una concentración significativa la cual fue del 90.93%.

Tabla VIII

Caracterización de compuestos

| Compuesto | Tiempo de retención | % correspondiente a la fracción |
|---------------|---------------------|---------------------------------|
| Alfa-pineno | 2.93 min | 0.14% |
| Sabineno | 3.99 min | 0.17% |
| Beta-pineno | 4.73 min | 0.50% |
| Octanal | 5.29 min | 0.10% |
| D-limoneno | 6.47 min | 94.0% |
| Octanol | 7.87 min | 0.03% |
| Terpinoleno | 9.58 min | 0.07% |
| Nonanal | 9.93 min | 0.04% |
| Linalool | 11.14 min | 0.48% |
| Citronela | 13.42 min | 0.003% |
| Octil-acetato | 15.26 min | 0.047% |
| Transcarveol | 15.82 min | 0.07% |
| Citronelol | 17.28 min | 0.02% |
| Nelol | 18.56 min | 0.03% |

(German, 2012)

German (2012) identificó 14 fracciones presentes en el aceite esencial de la cascara de naranja dulce (*Citrus sinensis*) de las cuales tan solo 1 fracción superaban el 1%, el D-limoneno constaba de una concentración significativa la cual fue del 94% mostrándose como el principal constituyente.

Tabla IX

Caracterización de compuestos

| Compuesto | Tiempo de retención | % correspondiente a la fracción |
|---------------------------|---------------------|---------------------------------|
| Alfa-pineno | 5.21 min | 0.5% |
| Beta-felandreno | 7.18 min | 0.49% |
| Beta-mirceno | 8.10 min | 1.75% |
| D-limoneno | 9.23 min | 90.96% |
| Gama-terpinoleno | 10.79 min | 1.64% |
| Octanal | 12.56 min | 0.19% |
| Decanal | 18.03 min | 0.23% |
| Linalool | 19.19 min | 1.26% |
| Octanol | 19.53 | 0.53% |
| Elementos sin identificar | N/A | 2.37% |

(Salazar, 2011)

Salazar (2011) identificó 9 fracciones presentes en el aceite esencial de la cáscara de naranja dulce (*Citrus sinensis*) de las cuales tan solo 4 fracciones superaban el 1%, de estas solo el D-limoneno constaba de una concentración significativa la cual fue del 90.96%.

Tabla X

Caracterización de compuestos

| Compuesto | Tiempo de retención | % correspondiente a la fracción |
|--------------|---------------------|---------------------------------|
| Alfa-Pineno | 9.97 min | 0.38% |
| Sabineno | 11.58 min | 0.20% |
| Beta-Mirceno | 12.11 min | 1.13% |
| D-Limoneno | 13.20 min | 89.68% |
| Linalool | 15.89 min | 0.59% |

(Osorio, 2015)

Osorio (2015) identificó 5 fracciones presentes en el aceite esencial de la cáscara de naranja dulce (*Citrus sinensis*) de las cuales apenas 2 fracciones superaban el 1%, de estas solo el D-limoneno constaba de una concentración significativa la cual fue del 86.68%.

3.9. Estudio comparativo de caracterización de la fracción predominante en aceite esencial D-Limoneno de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*)

Tabla XI

Comparación de fracción predominante

| Autor | Tiempo de retención | Método empleado | Cantidad relativa % de D-limoneno |
|---------------------------------|---------------------|----------------------------|-----------------------------------|
| Yáñez. Rueda (2007) | 21.95 min | Cromatografía de gas (FID) | 90.93 % |
| Salazar. I & Alzate. C (2011) | 9.23 min | Cromatografía de gas (MS) | 90.96 % |
| German. M (2012) | 6.47 min | Cromatografía de gas (FID) | 94% |
| Osorio. M, (2015) | 13.20 min | Cromatografía de gas (MS) | 89.68% |
| Presente Estudio Meza. E (2017) | 9.69 min | Cromatografía de gas (MS) | 97% |

(Yáñez, 2005) (German, 2012) (Salazar, 2011) (Osorio, 2015) (Meza. E 2017)

Al comparar la caracterización del aceite esencial de cáscaras de naranja con diferentes autores (Yáñez, 2005) (German, 2012) (Salazar, 2011) (Osorio, 2015) (Meza. E 2017) que analizaron el extracto de la naranja dulce (*Citrus sinensis*) por Cromatografía de gas acoplado a dos diferentes detectores (FID y MS) se logra confirmar que efectivamente el D-limoneno es la fracción predominante en el aceite esencial de la cáscaras de naranja variedad *Citrus*

sinensis lo que significa que este monoterpeno es la principal materia prima que se puede hallar en el extracto de las cáscaras de naranja; este monoterpeno se lo puede emplear en la elaboración de varios productos a nivel industrial como desengrasante, aromatizante, edulcorante, etc.

Las determinaciones que emplearon cromatografía de gases acoplada al detector de ionización de llama (FID) lograron detectar una mayor cantidad de fracciones presentes en el aceite esencial de la cáscara de naranja dulce (*citrus sinensis*), las fracciones detectadas que más se repiten entre los diferentes estudios previamente citados son el D-limoneno, mirceno, linalool y alfa-pineno también son las fracciones predominantes, los tiempos de retención y las concentraciones de las fracciones halladas fueron bastante aproximados tanto entre los análisis que emplearon cromatografía de gases (MS) y (FID).

Capítulo IV

Conclusiones

Mediante la técnica de arrastre de vapor se logró aislar un aceite esencial de la cáscara de naranja dulce (*citrus sinensis*) obteniendo un rendimiento promedio de 2.59% con una desviación estándar de 0.27% demostrando que los datos obtenidos tienen un bajo grado de dispersión.

Se evaluó las propiedades físicas y químicas del aceite esencial de la cáscara de naranja dulce (*citrus sinensis*) midiendo diferentes parámetros físicos los cuales correspondieron a una densidad de 0.859 mg/ml, un índice de refracción de 1.4707, un pH de 6.4, soluble en éter etílico, soluble en cetona 50%, parcialmente soluble en metanol e insoluble en agua. Los parámetros químicos determinaron un poder antioxidante por captura de radicales libres del 4.5% por diferencia de absorbancia entre el estándar con el radical libre y la muestra mezclada con el radical libre, se determinó la composición química del aceite esencial por medio una separación de sus componentes empleando cromatografía de gases y luego se identificó sus componentes por espectrometría de masas hallando en su composición D-limoneno, beta-mirceno y 3-careno.

El estudio comparativo mostró que la caracterizaron de los componentes de la cáscara de naranja dulce (*citrus sinensis*) analizada por cromatografía de gases confirmó que la fracción predominante en el aceite esencial de la cáscara de naranja (*citrus sinensis*) es el D-limoneno en un rango del 90 al 97 % mientras que las otras fracciones se encuentran en trazas o porciones insignificantes esto significa que el aceite esencial de la naranja dulce (*citrus sinensis*) es principalmente una fuente de D-limoneno.

Recomendaciones

La extracción por arrastre de vapor ya que esta emplea agua como solvente lo cual hace de este proceso una operación económica además debido a la naturaleza polar del agua es fácil de separar de la muestra.

Se recomienda realizar la prueba de la solubilidad antes de la evaluación de los parámetros químicos debido a que se elabora disoluciones de la muestra para los ensayos de DPPH y cromatografía de gas.

Se debe comparar los resultados con otros estudios que consideren la misma variedad de naranja y el mismo método de caracterización en este caso cromatografía de gases de ser posible usar el mismo tipo de detector para que las condiciones sean lo más parecidas posibles.

Se recomienda no descartar las cáscaras empleadas en la extracción de los aceites esenciales estas aún posee nutrientes y vitaminas subproducto de la biosíntesis de los aceites puede emplearse para elaborar piensos.

Bibliografía

- Acros Organics, N. (2008). *HOJA DE DATOS DE SEGURIDAD*.
- Aguilera, A. (2015). La destilación por arrastre de vapor como estrategia metodológica para fortalecer el aprendizaje sobre la obtención de aceites esenciales a partir de plantas medicinales y aromáticas con los estudiantes de tercer año de bachillerato paralelo "a", del cole.
- Arèalo, M. (2013). DETERMINACIONES CUANTITATIVAS EN NARANJA.
- Ark Pharm. (2013). *MATERIAL SAFETY DATA SHEET AK113983*.
- Ark Pharm. (2013). *MATERIAL SAFETY DATA SHEET AK-44487*.
- Christian, G. (2009). *México, Química Analítica sexta edición. McGraw Hill*.
- Constansa, A. (2015). Estandarización para el laboratorio de análisis de aguas y alimentos de la universidad tecnológica de Pereira del método para la determinación de metanol, etanol y alcoholes superiores en bebidas espirituosas a través de cromatografía.
- Coronado, M. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana.
- Dozal, M. (2010). Tesis: Técnica de análisis de aceite esencial de orégano por cromatografía de gases.
- ESPA. (2015). *encuestas de superficie y producción agropecuaria continúa*.
- FEED, RSS. (7 de junio de 2011). *www.ecniagricola.es*. Obtenido de <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:2uBYViF08MoJ:www.tecnicoagricola.es/partes-de-un-fruto-citrico-naranja-mandarina-limon-pomelo/+&cd=10&hl=es&ct=clnk&gl=ec>
- Franco, Y. (2015). *EVALUACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE HOJAS DE Citrus aurantifolia (LIMÓN SUTIL) citrus sinensis (NARANJA) Y Citrus nobilis (MANDARINA) MEDIANTE HIDRODESTILACIÓN*.
- García, A. (2009). *metabolismos secundario de las plantas*.
- García, D. (2015). Caracterización del contenido y de la composición de carotenoides en frutos de nuevos híbridos de cítricos.
- German, M. (2012). Diseño y evaluación in vivo de fórmulas para acné basadas en aceites esenciales de naranja (*Citrus sinensis*), albahaca (*Ocimum basilicum* L) y ácido acético.
- Grupo transmerquim. (2014). *HOJA DE DATOS DE SEGURIDADHOJA DE DATOS DE SEGURIDAD*.

- Lado, J. (2010). EL BUFADO: SUS CAUSAS Y ALTERNATIVAS DE CONTROL.
- Londoño, J. (2012). Libro: Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad.
- LUNA, H. A. (2007). Tesis: Obtención, caracterización y desterpenación del aceite esencial de naranja.
- Lyon, Z. (2016). *EXTRASYNTHÈSE HOJA DE DATOS DE SEGURIDAD*.
- Maldonado, D. (2014). *EL BUFADO: SUS CAUSAS Y ALTERNATIVAS DE CONTROL*.
- Martínez Vàsquez, A. (2014). Evaluación de actividad antioxidante y antimicrobiana del extracto de la cáscara de naranja (*Citrus sinensis*).
- Martínez, C. (2014). Extracción y caracterización de aceite esencial del limón (*Citrus limonium*).
- Merk-chemicals. (2010). *HOJA DE DATOS DE SEGURIDAD*.
- Navarro, J. (2015). Técnicas instrumentales y recursos analíticos.
- Osorio, M. (2015). Extracción, caracterización y actividad antioxidante del aceite esencial de *Plectranthus amboinicus* L.
- Pizarro, R. (2015). Aplicación de aceite esencial de naranja para la reducción de microorganismos en canales de res faenada en el camal de Paccha.
- Plaza, M. &. (2015). *Plaza, M & Ricalde, M (2015) Universidad Mayor, Real y Pontificia de San Francisco Xavier de Chuquisaca, Instituto de Tecnología de Alimentos (I.T.A)*.
- PRO ECUADOR. (2016). perfil sectorial de frutas no tradicionales.
<http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2016/04/PERFIL-FRUTAS-NO-TRADICIONALES.pdf>.
- PRO ECUADOR. (2012). inteligencia comercial e inversiones.
http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2013/11/PROEC_AS2012_FRUTAS.pdf.
- Rangel, G. (2010). Cuantificación de flavonoides (Catequinas) en cáscara de naranja variedad criolla (*Citrus sinensis*) producida en Norte de Santander.
- Research, J. o. (2015). Cuantificación de polifenoles y actividad antioxidante en extractos de cáscaras de *Citrus x sinensis* ecotipo Pica.
- ROTICHROM®. (2015). *ficha de seguridad conforme al Reglamento (CE) no 1907/2006 (REACH) modificado por 2015/830/UE*.
- Salazar, I. &. (2011). Evaluación del proceso integral para la obtención de aceite esencial y pectina a partir de cascara de naranja.

Sciencelab, Inc. (2013). *HOJA DE DATOS DE SEGURIDAD*.

Sepulveda, M. (2012). Tesis: Evaluación de la capacidad conservante de los aceites de clavo (*syzygium aromaticum*) y canela. Colombia: Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias Agropecuarias, Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos.

Skoog, D. (2008). Análisis instrumental 6ª edición. McGraw Hill. México .

Soto, L. (2012). Caracterización química del aceite esencial de toronja.

Tovar, J. (2013). Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la eco región cafetera.

Yáñez, R. (2005). Estudio del aceite esencial de la cáscara de la naranja dulce (*citrus sinensis*, variedad Valenciana) y cultivada en Labateca (Norte de Santander, Colombia) Bistua: Revista de.

Anexo I

Imagen 1 cáscaras para destilar



Imagen 2 troceado de la cáscara



Imagen 3 picnómetro vacío



imagen 4 picnómetro lleno



Imagen 5 destilación



Imagen 6 pesado de la muestra



Imagen 7 Refractómetro

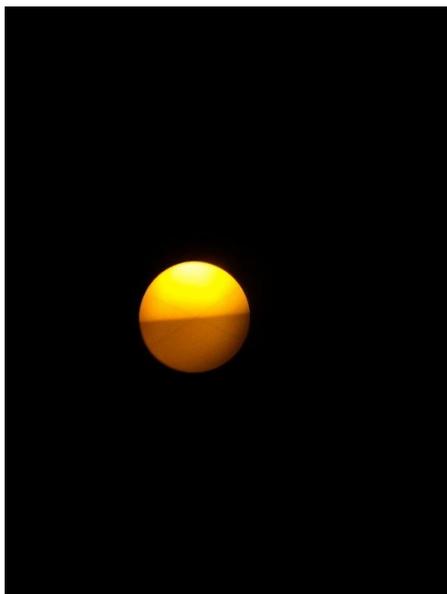


imagen 8 Refractómetro



Imagen 9 Armado del equipo vacío



Imagen 10 Armado del equipo lleno



Imagen 11 Extracto



Imagen 12 Cáscaras de naranja



Imagen 13 Decantado del extracto

Imagen 14 Recolección del extracto



Imagen 15 Decantado del extracto



Imagen 16 Decantado del extracto



Imagen 17 Balanza



Imagen 18 Pesado de la muestra



ANEXO II

Gráfico II

Cromatograma analítico gaseoso aceite esencial de naranja

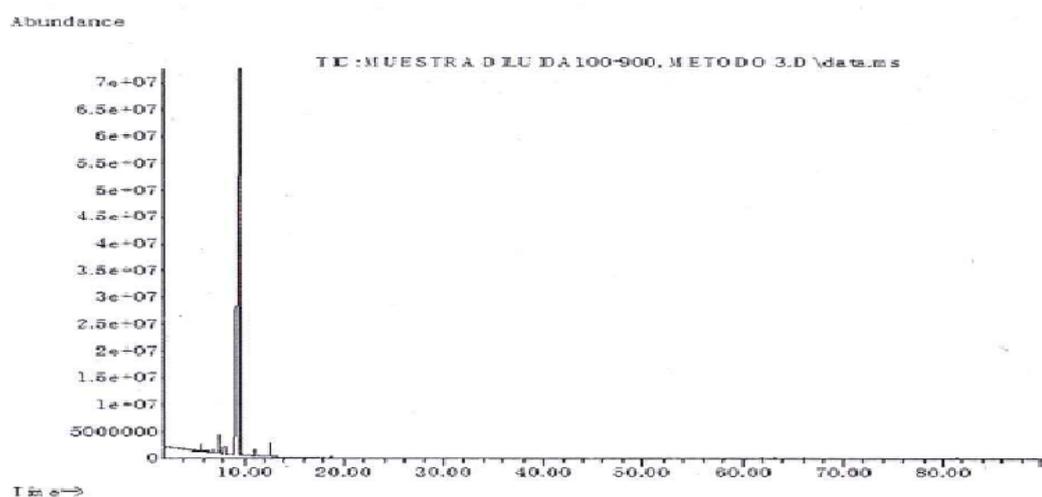


Gráfico III

Cromatograma 3D

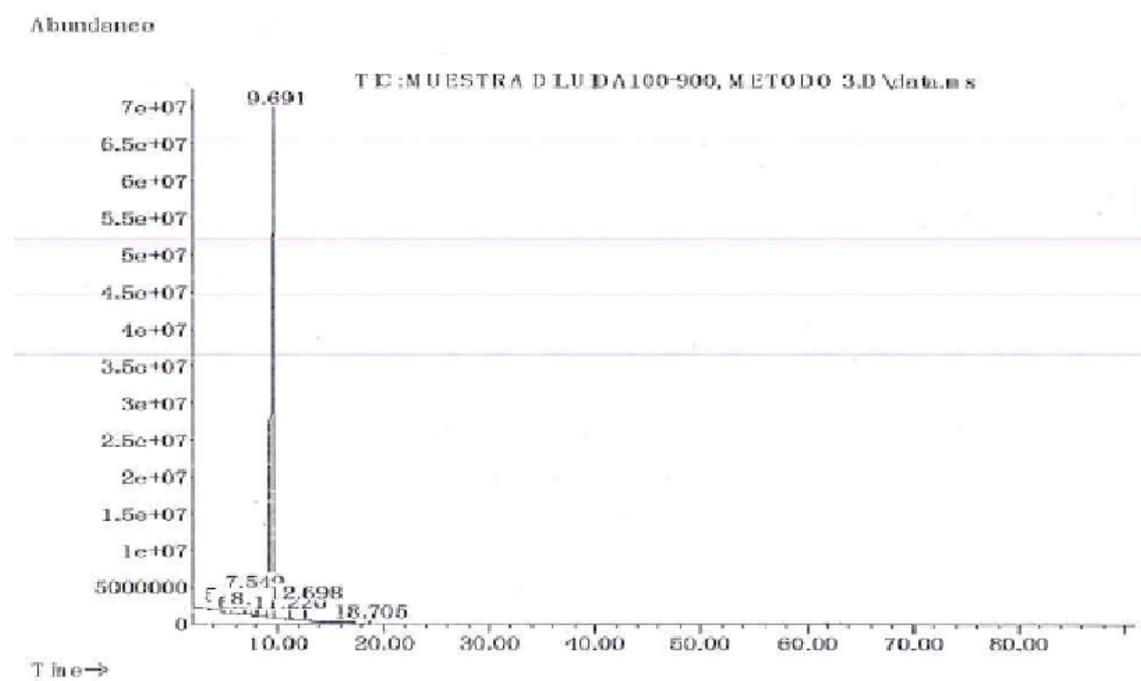


Gráfico IV

Analizador de cuadrupolos

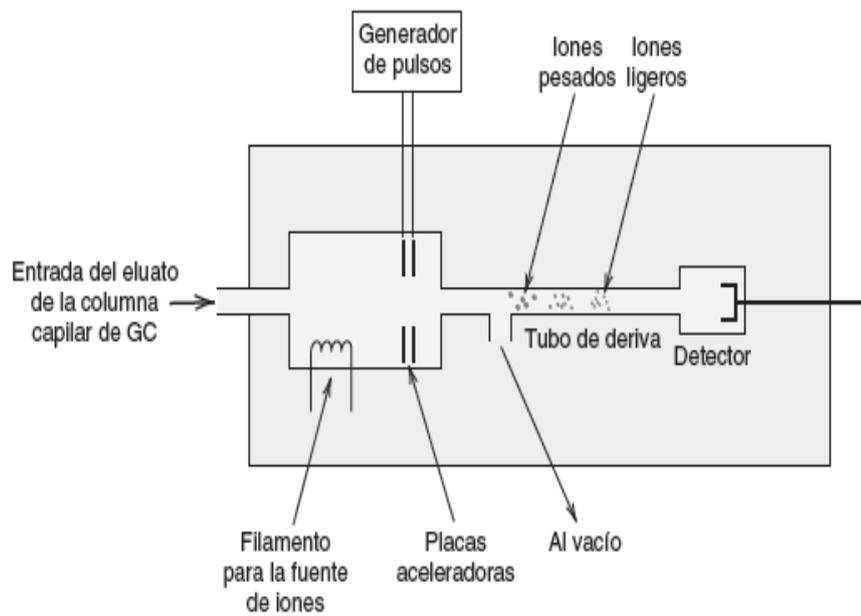
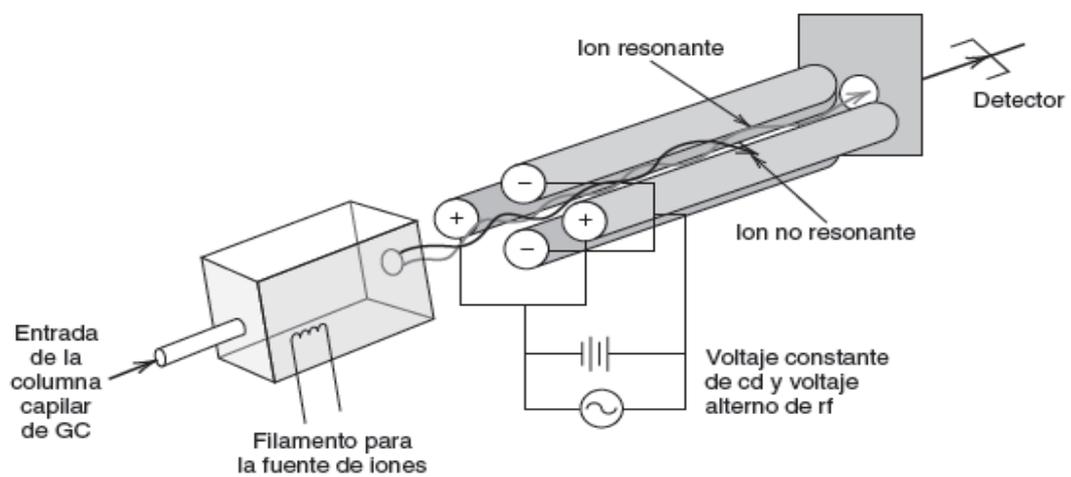


Gráfico V

Analizador de tiempo de vuelo



ANEXO III

| | | |
|---|---------------------------------------|--|
|  | FICHA TECNICA DE MATERIA PRIMA | CODIGO:09/RE/MP/24 REVISION:1 PAGINA :1 de 1 |
|---|---------------------------------------|--|

| | |
|-----------------------------|-------------------|
| PRODUCTO | D-LIMONENO |
| CODIGO DE PRODUCTO | 12500001 |
| CODIGO DE REFERENCIA | N/A |

| CARACTERISTICAS GENERALES | |
|----------------------------------|--|
| NOMBRE QUIMICO | D-LIMONENO |
| NOMBRE COMERCIAL | ACEITE ESENCIAL DE NARANJA (DESINFECTANTE, LAVAVAJILLA, PASTILLAS) |
| CLASE QUIMICA | Mezcla de sustancias olorosas |
| PROPIEDADES/APARIENCIA | Liquido, transparente, fluido |
| COLOR | Incoloro |
| OLOR | Característico |
| INSOLUBILIDAD | En agua |
| SOLUBILIDAD | En Alcohol o tensoactivos |

| CARACTERISTICAS ESPECIFICAS | |
|------------------------------------|-------------------------------|
| ANALISIS | RESULTADOS |
| INDICE DE REFRACCION | 1,4750-20.0°C / 1.4666-30.0°C |
| | |
| | |

| CARACTERISTICAS DE EMBALAJE | |
|------------------------------------|--|
| PRESENTACION | 1Kg-5Kg-20Kg-200Kg (Según requerimiento) |
| EMBALAJE | Envases de Vidrio o Metal/Lugar Fresco |
| IDENTIFICACION | Nombre Comercial, Codigo de Referencia y Numero de Lote. |

| OTROS REQUISITOS | |
|---|--|
| Certificado del lote cuando se trata de un nuevo lote | |
| Especificación Técnica cuando se solicita el producto por primera vez | |
| Hoja de Seguridad cuando se solicita por primera vez | |

| VARIABLES A INSPECCIONAR EN LA RECEPCION | | |
|---|--|-----------------|
| VARIABLE | METODO /INSTRUCTIVO | TIPO DE DEFECTO |
| APARIENCIA Y OLOR | Determinación de Características Organoelépticas | CRITICO |
| INDICE DE REFRACCION | Determinación de Índice de Refracción | CRITICO |

| | | |
|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| ELABORADO POR : | REVISADO POR: | APROBADO POR: |
| N.Ramírez | F.Jarrín | B.Jarrín |
| FECHA : 21/08/2008 | FECHA : 21/08/2008 | FECHA : 21/08/2008 |

La Impresión de este documento se considera copia No Controlada

Ampliar (Ctrl+0)

LUCTA GRANCOLOMBIANA S.A.S.
Aromas, Fragancias y Aditivos para nutrición animal
Flavors, Fragrances & Feed Additives

Carretera Autódromo - Termo eléctrica km 2.
Tocancipá, Cundinamarca, Colombia
Tel. (571) 593 4700 - Fax(571) 593 4720
www.lucta.com

Lucta

Certificado de Análisis

Para Departamento Calidad
Empresa CALBAQ S.A.

De Dept. Calidad LUCTA GRANCOLOMBIANA S.A.S
Fecha 25/04/16

Nos com place adjuntar el certificado de Análisis correspondiente a su pedido 1241

Producto D-LIMONENO 80113P

Lote C275426

N° pedido Lucta 15.311

Fecha de fabricación 08/04/16 **Fecha consumo preferente** 08/10/17

| Método/Parámetro | Especificación | Resultado |
|---------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Olor A-55000 | similar al standard | similar al standard |
| Aspecto A-175000 | líquido transparente fluido | líquido transparente fluido |
| Color A-177000 | incoloro | incoloro |
| Densidad 20°C (g/cc) A-184000 | 0,837 | 0,847 |
| Índice de refracción 20°C A-193000 | 1,4710 | 1,4740 |

Tabla XII

Terpenos de mayor interés

| Nombre genérico | Número de unidades de Isopreno | Numero de carbonos | Ejemplo | Función |
|-----------------|--------------------------------|--------------------|---------------------------------------|---|
| Monoterpeno | 2 | 10 | Mirceno limoneno | Desengrasante |
| Seisquiterpenos | 3 | 15 | Farnesol | Precursor de esteroidos |
| Diterpenos | 4 | 20 | Fitol Vitamina A | Precursor de la clorofila Contribuye a la visión |
| Triterpenos | 6 | 30 | Escualeno | Precursor de los esteroides |
| Tetraterpeno | 8 | 40 | B-caroteno | Precursor de la vitamina A |
| Pentaterpeno | 10 | 50 | | |
| Politerpeno | 11 | 55 | Bactoprenol o alcohol undecaprenilico | Síntesis de la pared celular bacteriana |

Tabla XIII

Derivados de los terpenos de gran importancia.

| Nombre | Número de unidades de isoprenos | Sustancia asociada | Función |
|---------------|---------------------------------|--------------------|---|
| Vitamina A | 4 | | Infertilidad antioxidante |
| Vitamina K | N | Quinona | Coagulación sanguínea |
| Vitamina Q | 6 a 10 | Quinona | Transporte de electrones |
| Plastoquinona | 9 | Quinona | Transporte de electrones asociados a la fotosíntesis |