



Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ingeniería
Escuela de Ingeniería Química

**EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA
OLEORRESINA DE LA HOJA DE LAUREL (*Litsea guatemalensis* Mez.) A
NIVEL LABORATORIO, UTILIZANDO TRES CONCENTRACIONES DE
SOLVENTE**

Keny Abdón López Salazar

Asesorado por: Inga. Telma Maricela Cano Morales

Guatemala, febrero de 2009

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERÍA

**EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA
OLEORRESINA DE LA HOJA DE LAUREL (*Litsea guatemalensis*
Mez.) A NIVEL LABORATORIO, UTILIZANDO TRES
CONCENTRACIONES DE SOLVENTE.**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE INGENIERÍA
POR

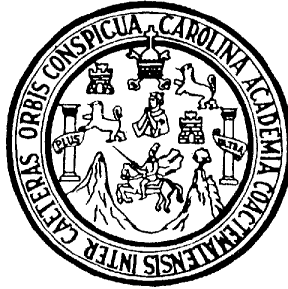
KENY ABDÓN LÓPEZ SALAZAR

ASESORADO POR: INGA. TELMA MARICELA CANO MORALES

AL CONFERÍRSELE EL TÍTULO DE
INGENIERO QUÍMICO

GUATEMALA, FEBRERO DE 2009

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE INGENIERÍA



NÓMINA DE JUNTA DIRECTIVA

DECANO	Ing. Murphy Olympo Paiz Recinos
VOCAL I	Inga. Glenda Patricia García Soria
VOCAL II	Inga. Alba Maritza Guerrero de López
VOCAL III	Ing. Miguel Angel Dávila Calderón
VOCAL IV	Br. José Milton De León Bran
VOCAL V	Br. Isaac Sultán Mejía
SECRETARIA	Inga. Marcia Ivónne Véliz Vargas

TRIBUNAL QUE PRACTICÓ EL EXAMEN GENERAL PRIVADO

DECANO	Ing. Murphy Olympo Paiz Recinos
EXAMINADOR	Ing. Otto Raúl de León de Paz
EXAMINADOR	Ing. César Alfonso García Guerra
EXAMINADOR	Ing. José Eduardo Calderón García
SECRETARIA	Inga. Marcia Ivónne Véliz Vargas

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

Cumpliendo con los preceptos que establece la ley de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración mi trabajo de graduación titulado:

EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA OLEORRESINA DE LA HOJA DE LAUREL (*Litsea guatemalensis Mez.*), A NIVEL LABORATORIO UTILIZANDO TRES CONCENTRACIONES DE SOLVENTE,

tema que me fuera asignado por la Dirección de la Escuela de Ingeniería Química, con fecha 14 de mayo de 2008.

Keny Abdón López Salazar



CENTRO DE INVESTIGACIONES DE INGENIERIA
FACULTAD DE INGENIERIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



Guatemala, 27 de agosto de 2008.

Ingeniero
Williams Guillermo Álvarez Mejía
Director
Escuela de Ingeniería Química


Respetable Ingeniero Álvarez:

De manera atenta me dirijo a usted para manifestarle que he revisado el informe final del trabajo de graduación titulado **“Extracción y Caracterización fisicoquímica de la oleorresina de la hoja de la laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.), a nivel laboratorio utilizando tres concentraciones de solvente”** desarrollado por el estudiante de Ingeniería Química, Keny Abdón López Salazar, quien se identifica con el carné número 200312347.

Habiendo encontrado el informe final de tesis del trabajo de graduación totalmente satisfactorio, por lo cual lo remito a su consideración.

Sin otro particular me suscribo de usted.

Atentamente,


Inga. Telma Maricela Cano Morales

Colegiado 433

ASESORA

Supervisora del laboratorio

Sección de Química Industrial

Centro de Investigaciones de Ingeniería / CII





UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

Guatemala, 21 de enero de 2008
Ref. EI.Q.007.2008

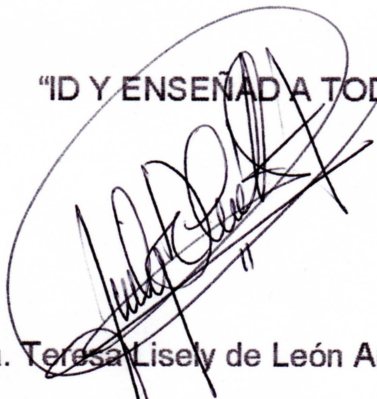
Ingeniero
Williams Guillermo Álvarez Mejía
DIRECTOR
Escuela de Ingeniería Química
Facultad de Ingeniería
Presente.

Estimado Ingeniero Álvarez:

Como consta en el Acta TG-100-08-B-IF le informo que reunidos los Miembros del Tribunal nombrado por la Escuela de Ingeniería Química, se practicó la revisión del informe final del trabajo de graduación, para optar al título de INGENIERO QUÍMICO al estudiante universitario **KENY ABDÓN LÓPEZ SALAZAR**, identificado con carné No. **2003-12347**, titulado: "**EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA OLEORRESINA DE LA HOJA DE LAUREL (*Litsea guatemalensis* Mez.), A NIVEL LABORATORIO UTILIZANDO TRES CONCENTRACIONES DE SOLVENTE**" el cual ha sido asesorado por la Ingeniera Química **Telma Maricela Cano Morales**, como consta en el Acta.

Habiendo encontrado el referido informe final **satisfactorio**, se procede a recomendarle autorice al estudiante **López Salazar** proceder con los trámites requeridos de acuerdo a normas y procedimientos establecidos por la Facultad para su autorización e impresión.

"ID Y ENSEÑADA A TODOS"


Inga. Teresa Lisely de León Arana, M.Sc.

COORDINADORA
Tribunal que revisó el informe final
Del trabajo de graduación



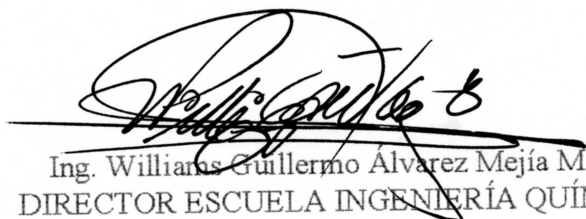
ESCUELA DE
INGENIERIA QUIMICA

C.c.: archivo



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

El Director de la Escuela de Ingeniería Química Ing. Williams Guillermo Álvarez Mejía, M.Sc. Después de conocer el dictamen del Asesor y de los Miembros del Tribunal nombrado por la Escuela de Ingeniería Química para revisar el trabajo de graduación de la estudiante **Keny Abdón López Salazar** titulado: **“EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE LA OLEORRESINA DE LA HOJA DE LAUREL (Litsea guatemalensis Mez.) A NIVEL LABORATORIO, UTILIZANDO TRES CONCENTRACIONES DE SOLVENTE”**, procede a la autorización del mismo, ya que reúne rigor, coherencia y calidad requeridos.


Ing. Williams Guillermo Álvarez Mejía M.Sc.
DIRECTOR ESCUELA INGENIERÍA QUÍMICA

Guatemala, febrero de 2,009

C.c.: archivo

Universidad de San Carlos
de Guatemala



Facultad de Ingeniería
Decanato

Ref. DTG.018.2009

El Decano de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer la aprobación por parte del Director de la Escuela de Ingeniería Química, al trabajo de graduación titulado: **EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA OLEORRESINA DE LA HOJA DE LAUREL (*Litsea guatemalensis* Mez.) A NIVEL LABORATORIO, UTILIZANDO TRES CONCENTRACIONES DE SOLVENTE**, presentado por el estudiante universitario **Keny Abdón López Salazar**, procede a la autorización para la impresión del mismo.

IMPRÍMASE.

Ing. Murphy Olympo Paiz Recinos
DECANO

Guatemala, febrero de 2009



/cc

ACTO QUE DEDICO A

Dios y la Virgen

Por la vida, el amor e infinitas bendiciones

Mis padres

Virginio Victor López Mazariegos, Dolores Salazar de López, por su amor, confianza, y por permitirme culminar mis estudios

Mis hermanas

Jacqueline Edilma López Salazar, Odalis Ivette López Salazar, por el cariño, apoyo, motivación y alegría que brindan a mi vida

Mis abuelos

Virginia Trujillo Franco, Juan Antonio Salazar Cardona (D. E. P.), Elsita López Mazariegos (D. E. P.), Victoriano López Alvarado (D. E. P.)

Mis tíos y primos

Con aprecio y respeto

Mis amigos

Luis Carlos, Nathaly, Viviana, Karina, Andrea, Genaro, Carlos, Delia, Andrea Isabel, Diana, Alejandra, Jennifer, Gabriela, Rubén, Luis Trabanino, Luis Méndez, Marielos, Francisco Paz, Keyla, Delmy.

AGRADECIMIENTOS A

LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Especialmente a la Facultad de Ingeniería

Mi asesora	Ingeniera Telma Maricela Cano Morales, por brindarme apoyo y transmitirme sus conocimientos
Mi revisor	Ingeniero César Alfonso García Guerra, por sus conocimientos compartidos
Licenciado	Juan Romeo Bejarano, por su amistad y apoyo profesional

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	VII
LISTA DE SÍMBOLOS	XI
GLOSARIO	XIII
RESUMEN	XVII
OBJETIVOS	XIX
HIPÓTESIS	XXI
INTRODUCCIÓN	XXIII
1. ANTECEDENTES	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Sustancias naturales puras y productos fitoterapéuticos	3
2.2. Laurel	3
2.2.1. Nombre	3
2.2.2. Sinonimias	4
2.2.3. Otros nombres populares	4
2.2.4. Descripción botánica	4
2.2.5. Hábitat	5
2.2.6. Historia	5
2.2.7. Agricultura	6
2.2.8. Fuentes	6
2.2.9. Atributos sensoriales	7
2.2.10. Usos medicinales atribuidos	7
2.2.11. Otros usos populares	7
2.2.12. Farmacología	8

2.2.13.	Composición química	8
2.2.14.	Extractos	9
2.2.15.	Farmacognosia	10
2.2.16.	Toxicología	10
2.2.17.	Indicaciones terapéuticas	11
2.3.	Oleorresinas	11
2.3.1.	Clasificación de las Oleorresinas	15
2.3.2.	Extracción de Oleorresinas	16
2.3.2.1.	Selección de solvente	16
2.3.2.2.	Lixiviación	18
2.3.2.3.	Maceración	21
2.3.2.4.	Percolación	22
2.3.3.	Materia prima	23
2.3.3.1.	Cultivo de plantas medicinales	23
2.3.3.2.	Recolección	24
2.3.3.3.	Procesamiento post cosecha	25
2.3.3.4.	Almacenamiento	26
2.3.3.5.	Molienda	27
2.3.4.	Análisis de la oleorresina	29
2.3.5.	Cromatografía en fase gaseosa	29
2.3.6.	Cromatografía líquida de alta resolución	30
2.3.6.1.	Tipos de HPLC	32
2.3.6.1.1.	Cromatografía de fase normal	32
2.3.6.1.2.	Cromatografía de fase reversa	33
2.3.6.1.3.	Cromatografía de exclusión molecular	35
2.3.6.1.4.	Cromatografía de	

	intercambio iónico	35
	2.3.6.1.5. Cromatografía basada en bioafinidad	36
2.3.6.2.	Cromatografía gas – líquido	36
2.3.6.3.	Análisis cualitativo	38
2.4.	Aceites esenciales	39
2.4.1.	Métodos de obtención de aceites esenciales	40
	2.4.1.1. Destilación por arrastre con vapor de agua	41
	2.4.1.2. Destilación con vapor	41
	2.4.1.3. Extracción con disolventes volátiles	42
	2.4.1.4. Extracción con fluidos supercríticos	43
	2.4.1.5. Enflorado	44
	2.4.1.6. Maceración	45
	2.4.1.7. Expresión	45
2.4.2.	Aceites encapsulados	46
2.4.3.	Especies solubles secas y líquidas	46
2.5.	Ventajas y desventajas de varios tipos de especies	47
2.5.1.	Especies frescas	47
	2.5.1.1. Ventajas	47
	2.5.1.2. Desventajas	47
2.5.2.	Aceites esenciales de especies	48
	2.5.2.1. Ventajas	48
	2.5.2.2. Desventajas	49
2.5.3.	Oleorresinas de especies	49
	2.5.3.1. Ventajas	49
	2.5.3.2. Desventajas	50
2.5.4.	Acuarresinas	51
	2.5.4.1. Ventajas	51

2.5.4.2.	Desventajas	51
2.5.5.	Aceites esenciales u oleorresinas encapsuladas	52
2.5.5.1.	Ventajas	52
2.5.5.2.	Desventajas	52
3.	METODOLOGÍA	55
3.1.	Localización	55
3.2.	Recursos humanos	55
3.3.	Obtención de las muestras	55
3.4.	Diseño de tratamientos	56
3.5.	Metodología experimental	58
3.5.1.	Materiales y equipo utilizados en la experimentación	58
3.5.1.1.	Materia prima	58
3.5.1.2.	Cristalería	58
3.5.1.3.	Equipo	58
3.5.1.4.	Reactivos	60
3.5.2.	Método de extracción de oleorresina a nivel laboratorio	60
3.5.3.	Métodos para la caracterización de la oleorresina, determinación de las propiedades fisicoquímicas de los extractos	61
3.5.3.1.	Determinación de densidad	61
3.5.3.2.	Determinación del índice de refracción	61
3.5.3.3.	Análisis cromatográfico	61
4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	63
4.1.	Rendimientos de los extractos de oleorresina de cada	

una de las concentraciones utilizadas.	66
4.2. Prpiedades fisicoquímicas de los extractos de oleorresina de cada una de las concentraciones utilizadas	67
4.2.1. Densidad de los extractos de oleorresina	67
4.2.2. Índice de refracción de los extractos de oleorresina	68
4.2.3. Separación de medias	69
5. RESULTADOS	71
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	77
CONCLUSIONES	81
RECOMENDACIONES	83
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
BIBLIOGRAFÍA	87
APÉNDICE A	89
APÉNDICE B	91
ANEXO	99

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

FIGURAS

1.	Oleorresinas y especies solubles obtenidas de especies frescas	53
2.	Plancha de calentamiento	58
3.	Bomba de vacío	59
4.	Balanza	59
5.	Refrigeradora	59
6.	Rotavapor	60
7.	Porcentaje de rendimiento de la oleorresina de laurel (<i>Litsea guatemalensis</i> Mez.) en función de la solución extractora	72
8.	Densidad a 20 °C de la oleorresina de laurel (<i>Litsea guatemalensis</i> Mez.) en función de la solución extractora	73
9.	Índice de refracción a 20 °C de los extractos e tanólicos de la hoja de laurel (<i>Litsea guatemalensis</i> Mez.) en función de la solución extractora	74
10.	Requisitos académicos para la elaboración de tesis en ingeniería química relativa a la extracción de oleorresina de laurel (<i>Litsea guatemalensis</i> Mez.)	89
11.	Diagrama de evaluación del proceso de lixiviación para la extracción de oleorresina de laurel (<i>Litsea guatemalensis</i> Mez.)	90
12.	Diagrama de granulometría de la molienda de la hoja	

de laurel (<i>Litsea guatemalensis</i> Mez.)	91
13. Diagrama de granulometría acumulada de la molienda de la hoja de laurel (<i>Litsea guatemalensis</i> Mez.)	92
14. Rendimiento porcentual promedio de la oleorresina de laurel (<i>Litsea guatemalensis</i> Mez.) en función de la solución extractora	97
15. Densidad a 20 °C de los extractos de la hoja de laurel promedio (<i>Litsea guatemalensis</i> Mez.) en función de la solución extractora	98
16. Índice de refracción a 20 °C de los extractos de la hoja de laurel promedio (<i>Litsea guatemalensis</i> Mez.) en función de la solución extractora	99
17. Cromatograma para la primera extracción de oleorresina de laurel (<i>Litsea guatemalensis</i> Mez.) utilizando etanol al 35%	101
18. Cromatograma para la segunda extracción de oleorresina de laurel (<i>Litsea guatemalensis</i> Mez.) utilizando etanol al 35%	102
19. Cromatograma para la tercera extracción de oleorresina de laurel (<i>Litsea guatemalensis</i> Mez.) utilizando etanol al 35%	102
20. Cromatograma para la primera extracción de oleorresina de laurel (<i>Litsea guatemalensis</i> Mez.) utilizando etanol al 70%	103
21. Cromatograma para la segunda extracción de oleorresina de laurel (<i>Litsea guatemalensis</i> Mez.) utilizando etanol al 70%	103
22. Cromatograma para la tercera extracción de oleorresina de laurel (<i>Litsea guatemalensis</i> Mez.) utilizando etanol al 70%	104
23. Cromatograma para la primera extracción de oleorresina de laurel (<i>Litsea guatemalensis</i> Mez.) utilizando etanol al 95%	104
24. Cromatograma para la segunda extracción de oleorresina de laurel (<i>Litsea guatemalensis</i> Mez.) utilizando etanol al 95%	105
25. Cromatograma para la tercera extracción de oleorresina de laurel (<i>Litsea guatemalensis</i> Mez.) utilizando etanol al 95%	105

TABLAS

I.	Organización de datos de ANDEVA	64
II.	ANDEVA	64
III.	Organización de datos ANDEVA de rendimientos de los extractos de oleorresina de cada una de las concentraciones utilizadas	66
IV.	Organización de datos ANDEVA de densidad de los extractos de oleorresina	67
V.	ANDEVA de densidad de los extractos de oleorresina.	68
VI.	Organización de datos ANDEVA del índice de refracción de los extractos de oleorresina	68
VII.	ANDEVA del índice de refracción de los extractos de oleorresina	69
VIII.	Rendimiento porcentual de oleorresina de laurel (<i>Litsea guatemalensis Mez.</i>)	71
IX.	Propiedades fisicoquímicas de oleorresina de laurel (<i>Litsea guatemalensis Mez.</i>)	71
X.	Síntesis del análisis de cromatografía de gas acoplada con espectrometría de masa (CG – EM) de oleorresina de laurel (<i>Litsea guatemalensis Mez.</i>)	75
XI.	Granulometría de la molienda de la hoja de laurel (<i>Litsea guatemalensis Mez.</i>)	91
XII.	Estadística descriptiva del rendimiento porcentual de oleorresina de laurel (<i>Litsea guatemalensis Mez.</i>)	93
XIII.	Estadística descriptiva de la densidad de los extractos etanólicos de la hoja de laurel (<i>Litsea guatemalensis Mez.</i>)	94

XIV.	Estadística descriptiva del índice de refracción de los extractos etanólicos de la hoja de laurel (<i>Litsea guatemalensis</i> Mez.)	94
XV.	Medias y desviaciones estándar obtenidas en el rendimiento de la oleorresina de laurel (<i>Litsea guatemalensis</i> Mez.)	95
XVI.	Medias y desviaciones estándar de la densidad obtenidos en los extractos etanólicos de la hoja de laurel (<i>Litsea guatemalensis</i> Mez.)	95
XVII.	Medias y desviaciones estándar del índice de refracción obtenidos en los extractos etanólicos de la hoja de laurel (<i>Litsea guatemalensis</i> Mez.)	96
XVIII.	Prueba de Tukey – Kramer para el rendimiento de la oleorresina de laurel (<i>Litsea guatemalensis</i> Mez.)	96
XIX.	Prueba de Tukey – Kramer para la densidad de los extractos etanólicos de la hoja de laurel (<i>Litsea guatemalensis</i> Mez.)	96
XX.	Prueba de Tukey – Kramer para el índice de refracción de los extractos etanólicos de la hoja de laurel (<i>Litsea guatemalensis</i> Mez.)	97
XXI.	Prueba de homogeneidad de rendimiento, densidad e índice de refracción para los extractos de la hoja de laurel (<i>Litsea guatemalensis</i> Mez.)	99

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Descripción
A	Amperio
CG	Cromatografía gaseosa
d_a	Diámetro de agitador
d_t	Diámetro de tanque
g	Gramos
h	Horas
hp	Caballo de fuerza
Hz	Hertz
H_0	Hipótesis nula
H_1	Hipótesis alternativa
km^2	Kilómetro cuadrado
L	Litro
lb	Libra
mg	Miligramos
μg	Microgramos
mm	Milímetro
min	Minuto
mL	Mililitros
N	Norte
No	Número
O	Oeste
pH	Potencial de hidrógeno

rpm	Revoluciones por minuto
SST	Suma total de cuadrados
SSA	Suma de cuadrados en tratamiento
SSE	Suma de cuadrados del error
s^2_1	Cuadrado medio del tratamiento
s^2	Cuadrado medio del error
v	Volumen (mL)
V	Voltio
w	Masa (g)
W	Watt
% (v/v)	Porcentaje en volumen
°C	Grados Celsius
σ	Desviación estándar

GLOSARIO

Aceite esencial	Líquido oleoso volátil e insaponificable que se obtiene de las diferentes partes de una planta.
Coadyuvante	Contribuye o potencia la acción de otros agentes.
Cromatografía	Método de análisis químico para la separación de los componentes de una mezcla por distribución entre dos fases, una estacionaria y otra móvil.
Destilación	Separación de los componentes de una mezcla líquida por medio de la ebullición basada en las diferencias de presión de vapor.
Difusión	Transferencia de moléculas individuales a través de un fluido por medio de los desplazamientos individuales y desordenados de las moléculas.

Extracto	Producto sólido o espeso obtenido por evaporación de un zumo o de una disolución de sustancias vegetales o animales.
Farmacognosia	Parte de la farmacología que estudia la acción de los medicamentos naturales.
Fitoterapéutico	Ayudante en el tratamiento de las enfermedades mediante plantas o sustancias vegetales.
Lixiviación	Eliminación de una fracción soluble a partir de una fase sólida permeable e insoluble a la cual está asociada.
Oleorresina	Preparados líquidos consistentes en aceites esenciales y materias resinosas.
Organoléptico	Característica de una sustancia que se percibe con los sentidos.
Rendimiento	Relación de masa de oleorresina extraída en comparación con la masa de materia prima inicial.
Resina	Sustancia sólida o de consistencia pastosa, insoluble en agua, obtenida naturalmente como producto que fluye de varias plantas.

Saporífero	Sustancia que produce sabor.
Soporífero	Sustancia que produce sueño.
Tamiz	Cedazo de malla utilizado para clasificar las partes gruesas de las finas.
Tamizaje fitoquímico	Es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta.
Termolábil	Alteración de las propiedades naturales de un producto por la acción del calor.
Terpeno	Nombre común a ciertos hidrocarburos que se encuentran en los aceites volátiles obtenidos de las plantas.

RESUMEN

Se evaluó el rendimiento de la oleorresina de las hojas de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.) a nivel laboratorio mediante lixiviación, utilizando como método de extracción maceración dinámica de la hoja molida, posterior filtración y concentración del extracto obtenido; se manejó como variables controlables, el tamaño de partícula comprendidos entre los tamices No. 5 (4 mm) y No. 200 (75 μ m) y 3 concentraciones de etanol (35, 70 y 95% v/v).

El método experimental se planteó como un diseño completamente al azar con un arreglo combinatorio, se llevaron a cabo 3 repeticiones de cada una, con lo que se realizaron a cabo 9 experimentos, manteniéndose constante una masa inicial de 50 gramos de hoja triturada y una relación de solvente de 1:10 (w/v). Para la interpretación estadística de los resultados experimentales se utilizó análisis de varianza con nivel de significancia del 5 %. Sobre la base del análisis estadístico se determinó que el rendimiento, la densidad, el índice de refracción y el número de componentes se ve afectado por la concentración del solvente utilizado. El etanol al 95% es el mejor para las extracciones de este tipo de oleorresina ya que el mayor rendimiento de oleorresina obtenido fue para este último con 22.03%, y es el extracto en donde mayor número de componentes se lograron identificar.

Se realizó un análisis cualitativo por medio de cromatografía gaseosa acoplada a la espectrometría de masa de la oleorresina obtenida para confirmar la presencia de los compuestos mayoritarios siendo 1, 8 – Cineol (14%), Linalool (22%) y Nerolidol (13%).

OBJETIVOS

GENERAL

Extraer y caracterizar la oleorresina obtenida de la hoja de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.), a nivel laboratorio por el método de lixiviación.

ESPECÍFICOS:

1. Evaluar el rendimiento de la oleorresina de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.) con base a un tamaño de partícula de la hoja y una relación sólido/líquido en función del porcentaje de etanol de cada solución extractora.
2. Determinar el índice de refracción y la densidad de cada uno de los extractos etanólicos de la hoja de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.) en función del porcentaje de etanol de cada solución extractora.
3. Identificar los componentes químicos de la oleorresina de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.), por medio de cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas.
4. Evaluar la existencia de diferencia significativa mediante el tratamiento estadístico para la evaluación de rendimientos y propiedades fisicoquímicas de la oleorresina obtenida de la hoja de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.) mediante un análisis de varianza.

HIPÓTESIS

El porcentaje de rendimiento, la densidad y el índice de refracción de la oleorresina de laurel, *Litsea guatemalensis* Mez., extraído por lixiviación mediante el método de maceración dinámica puede ser afectado significativamente por la concentración del solvente.

HIPÓTESIS ESTADÍSTICA

Hipótesis nula

H₀: El porcentaje de rendimiento de la oleorresina de laurel, *Litsea guatemalensis* Mez., extraído por lixiviación mediante el método de maceración dinámica no se ve afectado significativamente por la concentración del solvente.

$$\mu_1 = \mu_2 = \mu_3$$

Hipótesis alternativa

H₁: El porcentaje de rendimiento de la oleorresina de laurel, *Litsea guatemalensis* Mez., extraído por lixiviación mediante el método de maceración dinámica se ve afectado significativamente por la concentración del solvente.

$$\mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$$

Hipótesis nula

Ho: La densidad de la oleorresina de laurel, *Litsea guatemalensis Mez.*, extraído por lixiviación mediante el método de maceración dinámica no se ve afectado significativamente por la concentración del solvente.

$$\mu_1 = \mu_2 = \mu_3$$

Hipótesis alternativa

H₁: La densidad de la oleorresina de laurel, *Litsea guatemalensis Mez.*, extraído por lixiviación mediante el método de maceración dinámica se ve afectado significativamente por la concentración del solvente.

$$\mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$$

Hipótesis nula

Ho: El índice de refracción de la oleorresina de laurel, *Litsea guatemalensis Mez.*, extraído por lixiviación mediante el método de maceración dinámica no se ve afectado significativamente por la concentración del solvente.

$$\mu_1 = \mu_2 = \mu_3$$

Hipótesis alternativa

H₁: El índice de refracción de la oleorresina de laurel, *Litsea guatemalensis Mez.*, extraído por lixiviación mediante el método de maceración dinámica se ve afectado significativamente por la concentración del solvente.

$$\mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$$

INTRODUCCIÓN

Guatemala cuenta con una gran biodiversidad, y entre ésta se tiene gran cantidad de plantas medicinales y aromáticas en las que se encuentra el laurel; en Guatemala se han descrito tres especies nativas las cuales son: *Litsea glaucescens* HBK., *Litsea guatemalensis* Mez., *Litsea neesiana* (Schauer) Hemsl. Las hojas de estas especies tienen un olor aromático. Son bastante utilizadas en Guatemala para saborear comidas de distintas clases, especialmente sopas y carnes.

Las plantas aromáticas han sido utilizadas, durante siglos, en culinaria, en perfumería y como medicamentos; siendo las oleorresinas uno de sus principales productos. En el presente trabajo de tesis se realizó un estudio de extracción y caracterización de la oleorresina de la hoja de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.), a nivel laboratorio utilizando tres concentraciones de solvente, extraído por lixiviación mediante el método de maceración dinámica y así se determinó el rendimiento, además de las propiedades fisicoquímicas de las mismas y entre ellas: la densidad, índice de refracción y la composición química utilizando cromatografía de gases acoplado a la espectrometría de masa.

Las muestras de la especie fueron colectadas en las montañas de la Finca Chichabac, en el municipio de Tecpán, departamento de Chimaltenango, siendo éste el óptimo lugar, según la Flora de Guatemala y los diferentes herbarios consultados.

Se realizaron experimentos a nivel laboratorio, combinando los tamaños de partículas y distintas concentraciones de solventes llegando a determinar que el rendimiento de la oleoresina de laurel por extracción con lixiviación utilizando el método de maceración dinámica depende fundamentalmente de la concentración y del solvente que se utilice y al mismo tiempo esto también afecta la cantidad de componentes presentes en la oleoresina así como sus propiedades fisicoquímicas.

1. ANTECEDENTES

En el marco del proceso de Investigación que se realizó en la Sección de Química Industrial del Centro de Investigaciones de Ingeniería, se tienen proyectos de investigación en extractos vegetales como aceites esenciales, oleorresinas, taninos y colorantes.

Específicamente en la temática de oleorresinas se han realizado los siguientes trabajos de investigación:

En el año de 2004, Julio López asesorado por la Inga. Telma Cano, en el Centro de Investigaciones de la Facultad de Ingeniería de la USAC, realizó el estudio de tesis denominado “Evaluación del rendimiento de oleorresina de las hojas de laurel (*Litsea guatemalensis*) de Tecpán, Chimaltenango en función del tamaño de partícula, utilizando dos solventes distintos a nivel planta piloto”. Los resultados obtenidos demostraron que el máximo rendimiento de oleorresina es de 7.5 % además se ha podido establecer que entre el etanol y el hexano, el primero extrae más que el segundo.

Tito Vides, asesorado por la Inga. Telma Cano, en octubre de 2005 en el Centro de Investigaciones de la facultad de Ingeniería de la USAC realizó la investigación de tesis denominada “Obtención y caracterización de oleorresina de clavo (*Eugenia caryophyllata*, Thunb), cultivado en Guatemala, a nivel planta piloto”. La extracción se realizó por medio de maceración estática teniendo como variable el tiempo (12, 24, 36 hrs.) con la finalidad de determinar cuál era el mejor tiempo a la vez de conocer la pureza del producto obtenido y conocer si existió la presencia de Eugenol. El análisis cromatográfico de capa fina,

confirmó presencia del Eugenol, como el compuesto mayoritario, en las nueve extracciones; además que se determinó que no existe diferencia significativa en el rendimiento porcentual de oleorresina de clavo (*Eugenia cariophyllata*, *Thunb*) a diferentes tiempos de maceración.

En 2006 Deulofeu, Nora, quien fue asesorada por Inga. Telma Cano, de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala, realizó la investigación de tesis titulada “Determinación del rendimiento de la oleorresina de tres distintas clases de de cardamomo (*Elattaria cardamomum* *Maton*) cultivado en Alta Verapaz, extraída por maceración dinámica y dos solventes distintos, a nivel laboratorio” en esta investigación se determinó a través de un análisis cromatográfico de capa fina, los componentes mayoritarios de la oleorresina y a partir de cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masa la cantidad de componentes mayoritarios de la oleorresina. Se utilizó como método de extracción maceración dinámica. Se obtuvo el mayor rendimiento con un valor de 6.3% utilizando como solvente etanol.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Sustancias naturales puras y productos fitoterapéuticos

Los productos de origen natural puros se definen por su estructura química y son identificados por el análisis químico. Los productos fitoterapéuticos tienen composición química variable y, por consiguiente, son definidos por el proceso de extracción. Siendo así, dos factores son de importancia fundamental en la industrialización de productos fitoterapéuticos: la calidad de la materia prima utilizada y la opción para seleccionar el disolvente para la extracción.

2.2. Laurel

2.2.1. Nombre

El nombre completo de las tres especies de laurel que hay en Guatemala son los siguientes: *Litsea glaucescens* HBK., *Litsea guatemalensis* Mez., *Litsea neesiana* (Schauer) Hemsl. Las hojas de estas especies tienen un olor aromático. Son bastante utilizadas en Guatemala para saborear comidas de distintas clases, especialmente sopas y carnes. Manojos de ramas frescas o de hojas secas, se encuentran a la venta en la mayoría de mercados. Ramas recién cortadas y llenas de hojas son utilizadas en decoraciones en tiempos de fiesta, especialmente en la elaboración de arcos en calles.

2.2.2. Sinonimias

Litsea acuminatissima Lundell, *Litsea matudau* Lundell; *Tetranthera glaucescens* var. *subsolitaria* Maisn.

2.2.3. Otros nombres populares

Aguarel, laurelillo, dpac-tzé, sufricalla, zit-zuch.

2.2.4. Descripción botánica

Litsea glaucescens es un árbol de 3-12 m de alto, ramas glabras. Hojas coriáceas, pecíolos 18 mm de largo, lanceoladas, peninervadas. Inflorescencia en racimos axilares, 4-9 flores unisexuales. Fruto en drupa, negro, 7-9 mm de diámetro, rodeado por una cúpula.

Litsea guatemalensis tiene forma de arbusto o árbol pequeño, raras veces de más de 6 metros de alto, de ramas delgadas, cafés, cuando son jóvenes son vellosas; hojas con textura como el cuero, pecíolos de 1.5 cm. de largo o más pequeños, lanceoladas o lanceoladas elípticas, cerca de 8 cm. de largo y 2.5 cm. de ancho, con base aguda a semi – aguda, lustrosas y glabras, pinnada, y pálida por debajo, velloso y firme densa o escasa o con la edad frecuentemente sin vellos; pedúnculos simples, axilares, solitarios o fasciculados, cubiertos de pequeños vellos, 15 mm de largo o menos, 5 – 11 flores; brácteas del involucro con hojas caducas, los pedicelos rugosos, ligeramente más largos que las flores; sin tubo en el perianto, de segmentos ovales, subobtusos; filamentos sin velloso, de la mitad de largo que las anteras.

2.2.5. Hábitat

Litsea glaucescens es nativo de México a Centro América; en Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Huehuetenango, Quetzaltenango, San Marcos y Zacapa. *Litsea guatemalensis* es endémico de Guatemala, crece en bosques abiertos de pino y matorrales de 1500 – 3150 msnm; se ha descrito en Chimaltenango, Guatemala, Jalapa, Sacatepéquez y Sololá.

2.2.6. Historia

Género de más de 100 especies, unas 12 de América, en Guatemala se han descrito tres especies nativas que se usan indistintamente como laurel (*Litsea glaucescens* HBK, *Litsea neesiana* (Schauer) Hemsl. y *Litsea guatemalensis* Mez.). Hernández en 1790 la menciona con el nombre nahuatl Ecapátlli o medicina del viento y describe alguna de sus propiedades medicinales. Las hojas de las tres especies tienen olor muy parecido al del laurel europeo (*Laurus nobilis*), atribuyéndole propiedades similares. El laurel europeo se cultiva y usa medicinalmente desde los griegos y romanos; sus hojas eran las guirnalda que se daban a los ganadores de las olimpiadas.

Los emperadores de Roma eran coronados con hojas de laurel. Los ganadores de carreras de carrozas recibían coronas de laurel como símbolo de victoria. A los estudiantes distinguidos y jóvenes físicos se les daban semillas de laurel y eran llamados *bacculauraraeates*. En las cenas lujosas de la Edad Media, la especie se hervía junto con cáscara de naranja y era utilizada para humedecer los dedos.

Dioscorides afirma que las hojas son útiles para tratar enfermedades de la vejiga, picaduras de abeja y avispa y en inflamaciones en general.

2.2.7. Agricultura

Se obtiene principalmente por recolección en los campos de crecimiento silvestre en las regiones frías y montañosas del altiplano del país. Si bien es una planta relativamente frecuente en el país, raramente se encuentra en forma abundante en una localidad determinada. Se recomienda su conservación o cuando menos su manejo en las regiones de crecimiento silvestre. Se propaga por semilla, no existen cultivos establecidos en el país. Florea de febrero a junio, las hojas y flores se colectan hacia finales de la floración y se secan a la sombra.

En cuanto a *Laurus nobilis*, se propaga con dificultad por semillas o estacas que enraízan a las 6-9 meses. Las hojas se colectan en la mañana en cualquier época del año, se secan a la sombra durante 12-15 días con algún peso encima para que no se arruguen.

2.2.8. Fuentes

La planta del laurel, es cultivada en muchas partes del mundo, particularmente en países cercanos al mar mediterráneo: Francia, Grecia, Marruecos, Israel, Portugal, España, Turquía y Yugoslavia. Es cultivada, además, en Guatemala, México y Rusia.

Las hojas secas de la planta de laurel son llamadas *Bay Leaves* y no deben de confundirse con la *West Indian Bay (Pimienta Racemosa Miller)* o

con la *California Bay (Umbelleleria California Nott)* o con la variedad china que tienen un olor fenólico similar a las *West Indian Bay*.

2.2.9. Atributos sensoriales

El aroma de la hoja triturada es con fragancia dulce. El sabor aromático de la hoja se intensifica a los pocos minutos. Una hoja es suficiente para darle sabor a seis porciones de estofado o sopa. Las hojas se utilizan en la manufactura de aceites esenciales y oleorresinas.

2.2.10. Usos medicinales atribuidos

Para su uso por la población se usan indistintamente las tres especies. El cocimiento de hojas por vía oral se usa para el tratamiento de afecciones respiratorias (amigdalitis, males de la garganta, tos, tos ferina) y gastrointestinales (diarrea, cólico, úlcera), carencia de leche en la madre e hinchazón; por vía tópica se usa en lavado y baños para cansancio y epilepsia. El cocimiento de la corteza se usa para tratar mordeduras de culebras y de perros. En sahumeros se usa para parálisis. Se le atribuye propiedad aromática, antiséptica, astringente, balsámica, carminativa, emenagoga, emoliente, estimulante, espamolítica, febrífuga y pectoral.

2.2.11. Otros usos populares

Las hojas aromáticas son muy empleadas como condimento en la preparación de platillos como sopas, guisos y repostería, se usa en forma similar a *Laurus nobilis*. De las hojas se extrae un aceite etéreo con aplicación en la industria de cerveza y salchichas.

2.2.12. Farmacología

Estudios antifúngicos demuestran que la tintura de hojas de *Litsea guatemalensis* tiene moderada actividad contra *C. albicans* que no se confirmó; el extracto presenta actividad insecticida contra hormigas. Estudios farmacológicos demuestran que la infusión de hojas de *Litsea glaucescens* no tienen actividad espasmolítica en dosis de 15 g/kg en duodeno aislado de rata.

2.2.13. Composición química

Por su olor característico similar a *Laurus nobilis*, se asume que tiene un aceite esencial rico en derivados terpénicos y glicéridos de los ácidos láurico, oleico, palmítico y linoléico. El tamizaje fitoquímico de *Litsea guatemalensis* Mez., indica: alcaloides cuaternarios y no cuaternarios, saponinas, esteroides insaturados, cardenólidos, bufadienólicos, quercitina, estibina y taraxon; el aceite esencial contiene limoneno y citral. Por otro lado a través de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa se obtuvo que el aceite esencial de la especie antes mencionada contiene (Ortíz, 2005):

Monoterpenos oxigenados

- 1,8 – cineol
- Linalol
- Terpinen – 4 – ol
- Trans – dihidrocarvona
- Cis – dihidrocarvona
- Carvona
- l – carvona
- Borneol

Hidrocarburos monoterpénicos

Limoneno
 α – pineno
 γ – terpineno
 β – pineno
Canfeno
 p – cimeno

Fracción sesquiterpénica

Nerolidol
 β – cariofileno
Cis – α – bisaboleno

Otros

β – eudesmol
 α – eudesmol
Acetato de bornilo
Óxido de linalol (2)

El análisis proximal de 100 g de hojas de *Laurus nobilis* contiene: 188 calorías, agua (45.2 g), proteínas (4.2 g), grasa (1.2 g), carbohidratos totales (47.1 g), fibra (4.6 g), ceniza (2.3 g), calcio (187 mg), fósforo (70 g), hierro (5.3mg), carotenos (1050 μ g), tiamina (0.01 mg), riboflavina (0.21 mg), niacina (1.3 mg) y ácido ascórbico (46 mg). (Cáceres, 1996).

2.2.14. Extractos

Las hojas de laurel producen 30% de aceites volátiles de los cuales el 45 a 50% consiste en Cineol y otros compuestos como el linalool, eugenol, metileugenol, geraniol, geranil y esteres del eugenil. l – α - terpineol, α - pinene

y β – Phellandrene. En su aceite esencial se han identificado setenta y cuatro compuestos diferentes. De estos los compuestos mayoritarios son el 1,8 cineol con un 26.8%, el α -terpineol con un 14.5% y el linalool con un 10.8%. (Badui, 1993)

El aceite tiene un fresco y refrescante olor “alcanforado” parecido al eucalipto. Tiene un distintivo dulce, calmante, medicinal y picante sabor con bastante persistencia y un ligero amargo residual.

La oleorresina es un extracto verde oscuro extremadamente viscoso con un contenido de aceite volátil de 25 a 30 mL por cada 100 gramos. La oleorresina de laurel es muy potente 2.27 kg. (5.0 lb.) equivalen a 45.45 kg. (100 lb.) de hoja fresca en características de olor y sabor. (Badui, 1993)

2.2.15. Farmacognosia

La materia médica son las hojas secas, las que deben tener las características botánicas, fisicoquímicas y organolépticas que caracterizan a la especie oficial. El aceite esencial de *Litsea glaucescens* tiene el olor característico pero difiere en su composición química, contiene 10 compuestos más que *Laurus nobilis* y hay 17 compuestos comunes a ambos. La presencia de limoneno en el aceite esencial reduce la dismenorrea por inhibición de la biosíntesis de prostaglandina. (Ortíz, 2005)

2.2.16. Toxicología

No se encuentran referencias sobre la toxicidad de las tres especies nativas. (Cáceres, 1996)

2.2.17. Indicaciones terapéuticas

Por su similitud organoléptica con *Laurus nobilis* y su uso popular en alimentación y medicina, está indicado en el tratamiento de anorexia, digestión lenta, espasmo gastrointestinal, meteorismo y bronquitis crónica. Se recomienda administrar tres veces al día en dosis de 1 – 2 g / taza en infusión o 1 –2 mL de tintura 1:8 con etanol 35%.

Para uso tópico se recomienda la decocción de 5 hojas / taza en el tratamiento de estomatitis, faringitis y sinusitis, usada como colutorio, gargarismo o compresa; en alcoholato o pomada se usa como antirreumático, pediculicida y parasiticida. (Cáceres, 1996)

2.3. Oleorresinas

Las oleorresinas son extractos de naturaleza oleosa, obtenidos de especies o diferentes plantas que proporcionan a los productos color y/o sabor. Presentan múltiples ventajas de manejo, dosificación, estandarización, almacenamiento y control microbiológico contra el producto en polvo. Se obtienen de especies por medio de una extracción con disolventes orgánicos que después se eliminan por destilación, el producto resultante es un líquido que contiene una mezcla de los compuestos volátiles y no volátiles de la materia prima, aun cuando no se extraen todos los responsables del aroma. Las oleorresinas son muy viscosas y coloreadas y se usan en concentraciones muy bajas, normalmente de 5 a 10% con respecto a la especie de donde se extraen. (López, 2004)

Puesto que disolventes distintos pueden dar como resultado productos de diferentes características de olor a partir de la misma sustancia, la elección del

disolvente es uno de los factores más importantes en la extracción de la oleorresina. Después de la separación de las materias sobrantes se libera el extracto de su disolvente volátil mediante la destilación al vacío, lo que deja como residuo la oleorresina deseada.

En su obtención se pueden acarrear algunas sustancias indeseables que dependen de la polaridad del disolvente y del contenido de humedad de la materia prima; las contaminaciones más importantes se deben a la presencia de taninos, azúcares, almidones, resinas y pigmentos, que se eliminan por medio de algunos tratamientos de solubilización, filtración o centrifugación; el paso que requiere de más precaución es la concentración, ya que sus constituyentes son muy sensibles a las altas temperaturas y se destruyen con facilidad.

Las oleorresinas de especias, que constituyen la forma líquida más concentrada de la especia, reproducen el carácter de la especia con mucha mayor plenitud que los aceites esenciales. Se utilizan principalmente como agente saporífero en alimentos. Como su elevada concentración hace difícil que las oleorresinas como tales se incorporen a las mezclas de los productos alimentarios, se dispersan en una base seca, por ejemplo, harina, bizcocho y dextrosa. Más recientemente se ha desarrollado una técnica para encapsular oleorresinas con goma impermeable. Las oleorresinas son de empleo más económico, de más fácil control de calidad y más limpias que las especias molidas equivalente; su ventaja sobre los aceites esenciales equivalentes, aparte de las ya mencionadas, es que son más estables cuando se calientan.

Las compañías manufactureras de sabor en Estados Unidos las requieren en gran cantidad. Compañías como Stange Company y Laboratorios Griffith en Chicago son las pioneras en el desarrollo de oleorresinas. Las oleorresinas de

la pimienta negra y el jengibre eran solamente curiosidades de laboratorio en los años 30. Los tecnólogos comenzaron a explorar y descubrir formas de mejorarlas y de utilizarlas en alimentos como si éstas fueran las especies originales de las cuales se derivan.

Las oleorresinas que primero se desarrollaron fueron extraídas de las especies con solvente, extrayendo el solvente por medio de vacío y luego el material inerte era tirado. La oleorresina resultante era de una apariencia pesada (como ver asfalto) en forma de masa, rica en compuestos aromáticos, no siempre agradables, inapetecibles por su apariencia, y, debido a su viscosidad, difícil de trabajar. Muchos de los solventes utilizados inicialmente eran peligrosos, eran inflamables y a veces explosivos si no se les manejaba con cuidado. Acetona, hexano, éter y varios alcoholes son ejemplos de estos solventes peligrosos. Estos medios de extracción no eran solventes completos ya que no extraían los compuestos hidrofílicos de la especie, que también contribuye al completo sabor de la especie. La industria se inclinó por el uso de hidrocarburos clorados, debido a que tiene un punto de ebullición bajo, no es inflamable, es de fácil recuperación y es un solvente completo, produce una oleorresina de cuerpo completo, rica en todos los compuestos saborizantes de la especie original. Sin embargo, los solventes clorados han caído en desuso en casi todo el mundo debido a su alto potencial carcinógeno. (Badui, 1993)

Las oleorresinas se componen principalmente de aceite esencial, resinas orgánicas solubles y otros materiales relacionados con la especie original como ácidos grasos no volátiles. La cantidad de aceite graso presente depende de la materia prima así como del tipo de solvente utilizado. Las semillas de especies producen más aceites grasos que las demás partes de la planta. Los compuestos no volátiles, como los que contribuyen al olor fuerte y picante de la pimienta negra, son iguales de importantes que los aceites esenciales volátiles,

si lo que se desea es un sabor completo a pimienta negra. Los compuestos deben de estar en la misma proporción en la que están en la especie original. Las resinas y los aceites grasos actúan como conectores naturales de los compuestos más volátiles del aceite esencial.

Algunas oleorresinas libres de solvente son difíciles de manejar debido a su alta viscosidad. En esos casos, se le agrega propilenglicol o un aceite graso para hacer más fluido el producto.

Ciertas oleorresinas son alteradas para ofrecer más ventajas al producto terminado. Por ejemplo Fritzsche Dodge&Olcott Inc. produce una superresina que es básicamente una mezcla de oleorresina y de aceite esencial de la misma especie, estandarizado para producir un producto más potente y que esté lo más cercano a la especie original en características de aroma y sabor cuando se utiliza en las cantidades recomendadas para obtener un sabor equivalente al de la especie original.

La misma compañía posee un producto con marca registrada llamado Bakeresins preparado específicamente para utilizarlo en productos horneados. La diferencia principal en este nuevo producto es el tipo de aceite esencial utilizado. Este es más apropiado para productos horneados y equivalente en calidad a la especie utilizada en la industria del horneado.

Kalsec, Inc. ha introducido recientemente una nueva serie de oleorresinas bajo el nombre de Aquaresins. Estas son más dispersables en agua y otros solventes polares por medio de la agitación, también en aceites y otros solventes no polares. Éstos están formulados para ser utilizados en sazonadores líquidos y no son muy adecuados para dispersarlos en medios comestibles secos.

Estas acuaresinas son estandarizadas con mono, di y triglicéridos, lecitina y ácido láctico, todos derivados de fuentes naturales. La producción de oleorresinas, superresinas, acuaresinas y otros productos similares no está limitada a estas dos compañías solamente. Otros productores calificados abastecen productos comparables a la industria alimenticia y no deben pasarse por alto.

En la manufactura de productos saborizantes para productos cárnicos preparados, sopas instantáneas, salsas; muchos de estos extractos son mezclados en proporciones ya formuladas por el fabricante de sabores para producir una densidad de sabor similar al que se obtendría con la mezcla de especies frescas, y en ocasiones a un costo menor. (López, 2004)

Es necesario mencionar que algunas oleorresinas tienen un sabor muy concentrado, la mayoría es difícil de pesar exactamente para mezclarse con otros ingredientes, los ingenieros en alimentos han tenido la necesidad de dispersar estos compuestos en un medio adecuado si estos se van a utilizar extensivamente en operaciones de manufactura. De aquí nació la idea de especies solubles. (Badui, 1993)

2.3.1. Clasificación de las Oleorresinas

Las oleorresinas son preparados líquidos consistentes en aceites esenciales y materias resinosas. Pueden dividirse en dos grandes grupos (Deulofeu, 2006):

- a) Las que se preparan con especias y hierbas por extracción con disolventes volátiles: dentro de ésta categoría se encuentran las oleorresinas de especias, es importante distinguirlas de las acuarresinas,

que típicamente se preparan por extracción con alcohol acuoso y no con disolventes. Se utilizan principalmente como agente saporífero en la industria de elaboración de alimentos.

- b) Las que se preparan a partir de cualquier parte odorífera de la planta, exceptuadas las flores, cuyo empleo principal es la perfumería.

Las oleorresinas de especias corresponden por entero a la primera categoría; hay que distinguirlas de las llamadas acuarresinas, que típicamente se preparan por extracción con alcohol acuoso y no con disolventes, aunque hay cierta superposición en las aplicaciones de ambos tipos de productos. (UNCTAD, 1986).

2.3.2. Extracción de Oleorresinas

Las oleorresinas de especias se obtienen de especias deshidratadas por extracción con un solvente volátil no acuoso, los solventes empleados son eliminados casi completamente por procesos de destilación al vacío, destilación azeotrópica o ambas. La oleorresina de laurel se obtiene por extracción con solventes (hexano, etanol, entre otros), utilizando hojas de laurel deshidratado con un porcentaje de humedad inferior al 10 %.

2.3.2.1. Selección de solvente

Antes de empezar el proceso extractivo en una escala piloto o industrial, se debe definir la selectividad del solvente a ser usado en el proceso. Cuando se desea que estén presentes la mayor parte de los constituyentes químicos de la planta, normalmente se utiliza un solvente de naturaleza general, de alta polaridad, como alcohol metílico o metanol. La escogencia del solvente de

extracción, así como la permanencia en la composición química de la materia vegetal, representan dos aspectos de suma importancia.

Según López (2004) puesto que disolventes distintos pueden dar como resultados productos de diferentes características de olor a partir de la misma sustancia, la elección del disolvente es uno de los factores más importantes en la extracción de la oleorresina.

Al entrar en contacto la materia seca molida con el solvente se inicia un proceso de reconstrucción de la célula a su estado original. Inicialmente el solvente penetra en la célula vegetal y expelle el aire contenido en el citoplasma, dándose inicio el proceso extractivo. La penetración del solvente en la célula induce un momento bipolar en las moléculas de los compuestos que serán extraídos; es así como las sustancias extraíbles se adhieren a las moléculas del solvente.

Las siguientes propiedades de un solvente deben considerarse antes de su utilización: selectividad, recuperabilidad, coeficiente de distribución, solubilidad, densidad, tensión superficial y toxicidad. En la extracción de oleorresinas se utilizan solventes orgánicos, incluso mezclas azeotrópicas, debido a que éstas mantienen la misma concentración relativa de sus componentes al alcanzar su punto de ebullición.

Durante la extracción se presentan dos fenómenos paralelos; la lixiviación de las sustancias solubles de células rotas de una manera rápida y la disolución y difusión de las sustancias solubles de células intactas de una manera lenta, requiriendo etapas de humedecimiento y ablandamiento con el objeto de aumentar la permeabilidad de la membrana.

En conclusión el proceso de extracción esta compuesto de tres etapas: la penetración del solvente en la célula, la disolución de las sustancias extraíbles y la difusión de la solución fuera de la célula vegetal. Este proceso de extracción involucra la remoción del componente deseado del material vegetal con un menstruo apropiado, la evaporación de todo o casi todo el disolvente y el ajuste de los fluidos residuales, masa o polvos a estándares prescritos. Sustancias inertes apropiadas pueden ser agregadas como vehículos o diluyentes para mejorar las características físicas. Se pueden añadir antimicrobianos y otros preservativos apropiados para mantener la integridad. Los extractos pueden ser sometidos a procesos que incrementen el contenido de constituyentes caracterizados, disminuyan el contenido de compuestos no deseados, o ambos. Los extractos a los que no se les han añadido sustancias inertes y no ha sido sometido a ningún proceso, excepto el de la extracción, se les conoce como “extractos nativos” o “crudos”. (Deulofeu, 2006).

2.3.2.2. Lixiviación

Esta operación unitaria se define como la eliminación de una fracción soluble, en forma de solución, a partir de una fase sólida permeable e insoluble a la cual está asociada. La separación implica, normalmente, la disolución selectiva, con difusión o sin ella, pero en el caso extremo del lavado simple, consiste sólo en el desplazamiento (con alguna mezcla) de un líquido intersticial por otro, con el que es miscible. El constituyente soluble puede ser sólido o líquido y estar incorporado, combinado químicamente o adsorbido, o bien mantenido mecánicamente, en la estructura porosa del material insoluble. El sólido insoluble puede ser másico y poroso: con mayor frecuencia es de partículas y estas últimas puede ser de poros abiertos, de celdas, con paredes celulares selectivamente permeables o con superficies activadas.

Debido a su gran variedad de aplicaciones y su importancia para diferentes industrias antiguas, la lixiviación tiene otros nombres. Entre los que se encuentran en la ingeniería química están la extracción, la extracción de sólido – líquido, la percolación, la infusión, el lavado y la decantación por sedimentación. La corriente de sólidos lixiviados y el líquido que la acompaña se denominan lodos; en hidrometalurgia también se conoce como pulpa. El contenido en sólidos de las corrientes es denominado, en algunas ocasiones, como marca (en particular en los procesos de separación de aceites). La corriente de líquido contenido en la solución lixiviada es el clarificado. Como abandona el proceso de lixiviación, tiene otros nombres opcionales: extracto, solución, lixiviado o miscelado.

El mecanismo de la lixiviación puede incluir una solución física simple o la disolución facilitada por una reacción química. La velocidad de transporte de disolvente en la masa que se va a lixiviar o de la fracción soluble en el disolvente o de la solución de extracto del material insoluble, o alguna combinación de esas velocidades, pueden ser importantes. Es posible que exista una resistencia externa. Como el que una reacción química puede afectar a la velocidad de la lixiviación.

Ya que las corrientes de lodo y clarificado no son fases inmiscibles, sino corrientes basadas en el mismo disolvente, el concepto de equilibrio en lixiviación no es el mismo que el que se aplica en otras separaciones de transferencia de materia. Si el soluto no se adsorbe en el sólido inerte sólo se logra el equilibrio verdadero cuando todo el soluto se disuelve y se distribuye en forma uniforme en todo el disolvente, tanto en la corriente de lodos como la de clarificación (o cuando el disolvente se satura uniformemente con el soluto, situación que nunca se presenta en un equipo de extracción diseñado de forma

adecuada). La interpretación práctica del equilibrio de lixiviación es el estado en que las corrientes de lodos y clarificado tiene la misma composición.

Sin embargo, y por lo general, no resulta sencillo establecer una eficiencia de etapa o un valor de eficacia global ni un índice de velocidad de lixiviación (es decir, un coeficiente general) sin probar los modelos a pequeña escala de los aparatos. De hecho, los resultados de dichas pruebas tienen que escalarse en forma empírica, sin una evaluación explícita de los índices de velocidad o de cuasi – equilibrio.

Los equipos de lixiviación se distinguen por el ciclo de operación (intermitente, continuo o intermitente de cargas múltiples), por la dirección de las diferentes corrientes (concurrente, a contracorriente o flujo híbrido) por el número de etapas (una única etapa, etapas múltiples o etapa diferencial) y por el método de contacto (percolación por pulverización, percolación por inmersión o dispersión de sólidos). En general, los anteriores descriptores catalogan cuatro categorías y deben consignarse para el establecimiento completo de un sistema de lixiviación.

Sea cual sea el mecanismo y el método de operación, resulta evidente que el proceso de la lixiviación estará favorecido por el aumento de la superficie por unidad de volumen de sólidos que se deben lixiviar y por la disminución de las distancias, en sentido radial, que se deben atravesar al interior de los sólidos, y la disminución del tamaño de las partículas contribuye a ambas cosas. Por otra parte, los sólidos finos provocan una velocidad lenta de percolación, dificultan la separación de sólidos y producen un sólido de mala calidad. Estas características establecen las bases para un tamaño óptimo de partículas.

2.3.2.3. Maceración

Consiste en poner en contacto la materia vegetal y el solvente, durante varios días, con agitación ocasional, es un proceso lento que se conoce como proceso de maceración simple o estática. Cuando se requiere abreviar el tiempo de operación, se recurre a la agitación constante de la especie y el solvente denominándose proceso de maceración dinámica.

Este proceso tiene como resultado el equilibrio entre la especie y el solvente, dependiendo de factores relacionados con la especie como: naturaleza, tamaño de partícula, contenido de humedad y cantidad. Y factores relacionados con el solvente como: selectividad y cantidad.

La velocidad con la que se obtiene el equilibrio esta en función del tamaño de partícula de la especie, del grado de hinchamiento de las células (proporcionando permeabilidad a la pared celular y la difusión del solvente) y de las propiedades del solvente.

El rendimiento del extracto disminuye cuando la relación especie/solvente aumenta. La maceración tiene como etapa final el prensado o centrifugación del residuo con el objeto de recuperar la parte del extracto retenido en él.

A manera de resumen a menos que se especifique lo contrario, el material crudo que se va a extraer, es reducido a pedazos de tamaño apropiado, mezclado con el solvente especificado y dejado en reposo a temperatura ambiente en un recipiente por tiempo apropiado, con frecuente agitación hasta que la materia soluble se disuelva. La mezcla se filtra, el material insoluble se lava con el mismo disolvente utilizado para la maceración y los filtrados se

combinan y concentran a la consistencia deseada, bajo presión reducida y temperatura controlada. (Deulofeu, 2006)

2.3.2.4. Percolación

Consiste en pasar el solvente a través de la especie, hasta su completa extracción. Se utiliza una etapa preliminar de humedecimiento de la especie, para facilitar el paso del solvente, aumentando el contacto, evitando la formación de falsas vías que perjudican la eficiencia del proceso. (Vides, 2005)

La etapa preliminar de humedecimiento aumenta la porosidad de la pared celular, facilitando la difusión de las sustancias extraíbles hacia el exterior de la célula. Esta etapa debe realizarse fuera del percolador, para evitar el exceso hinchamiento de la especie, que se comprimiría en las paredes del percolador interrumpiendo el paso del solvente.

En la manufactura de los extractos la percolación es el método más común. La materia cruda a ser extraída se reduce a pedazos de un tamaño apropiado, si es necesario, luego se mezcla íntimamente con una porción del disolvente especificado y se deja reposar por 15 minutos. La mezcla se transfiere al percolador y se añade cantidad suficiente del solvente especificado para cubrir toda la masa sólida. La mezcla se deja percolar lentamente (a una tasa no mayor de 1 mL/min. para 1000 gramos de material), cubriendo siempre la muestra con una capa de disolvente. El residuo puede ser sometido a presión y el fluido obtenido es combinado con el percolado. El percolado es concentrado, generalmente por destilación bajo presión reducida, de manera que los constituyentes de interés sean sometidos a la menor cantidad de calor posible.

2.3.3. Materia prima

2.3.3.1. Cultivo de plantas medicinales

El establecimiento de un cultivo de plantas medicinales se recomienda cuando, existen pocas plantas nativas, las plantas nativas tienen una distribución muy dispersa, son inaccesibles (recolección de plantas en áreas montañosas y geográficamente muy accidentadas o recolección de hojas de árboles muy altos), hay necesidad de mejorar el contenido de los principios activos, solamente una especie presenta alto contenido de constituyentes de interés; el cultivo produce una mayor productividad y un mayor contenido de los constituyentes de la planta debido a las buenas prácticas de agricultura, mejores condiciones del suelo y mejor control de plagas y las enfermedades, el cultivo permite un mejor y más rápido procesamiento de la planta recolectada, como el secado y el empaque, o cuando las primeras etapas de la extracción deben hacerse en el lugar de recolección, existe una gran demanda en el mercado.

El establecimiento de un cultivo de plantas medicinales puede involucrar la domesticación de las especies nativas de la región que tienen uso en la medicina popular y que poseen una acción farmacológica confirmada en estudios científicos. Puede involucrar también, la introducción y la aclimatación de plantas exóticas, con acción farmacológica comprobada, originaria de otras regiones o, incluso, de otros continentes. En ambos casos, la experimentación agronómica debe acompañarse de un estudio fitoquímico. El seguimiento fitoquímico tiene como base el análisis cualitativo y cuantitativo de los principios activos de la planta y la detección de sustancias indeseables.

Las plantas medicinales se diferencian de los demás productos agrícolas. Mientras en un cultivo tradicional de plantas alimenticias la productividad es medida por la cantidad producida en una determinada área, en un cultivo de plantas medicinales lo más importante es la cantidad de principios activos presentes en la planta, o sea que la productividad es medida multiplicando la cantidad de materia vegetal producido por el contenido de los principios activos y expresando el resultado en cantidad de principios activos producidos por unidad de área.

2.3.3.2. Recolección

Para cada planta medicinal existe un momento adecuado para realizar su recolección. La determinación de los principios activos permite establecer con exactitud el tiempo correcto de la recolección. Sin embargo, para las plantas cuyos principios activos todavía no se conocen, pueden aplicarse algunas reglas generales.

Las plantas herbáceas y las hojas deben recolectarse cuando se inicia la floración. Algunas plantas permiten más de un corte. A veces, cuando hay períodos secos y lluviosos muy definidos, la recolección de hojas se hace durante el período seco, lo que permite que la planta se regenere durante el período de lluvias.

Los períodos de sequía y de lluvia influyen en el contenido de los principios activos. Por ejemplo, el contenido de los alcaloides disminuye después de las lluvias y el de los aceites esenciales aumenta. El contenido de los aceites esenciales disminuye después de la época seca. El contenido de los principios activos varía según el período del día.

En general, los glicósidos alcanzan su mayor concentración en la tarde, mientras los aceites esenciales alcanzan su máxima concentración alrededor del mediodía, a excepción de la manzanilla (*Matricaria recutita*), que alcanza durante la noche la máxima concentración y una calidad mejor de su aceite esencial.

2.3.3.3. Procesamiento post cosecha

El procesamiento post cosecha tiene como objetivo la conservación de las características físicas, químicas, organolépticas y farmacológicas de la droga vegetal. Un procesamiento post cosecha inadecuado da como resultado una materia prima de baja calidad, con pérdida de principios activos, así como un aumento de la carga microbiana y una pésima presentación comercial.

Las pérdidas de principios activos involucran: degradación por procesos metabólicos, hidrólisis de los compuestos, descomposición por la luz, descomposición enzimática, degradación de las sustancias termolábiles debido al calor, volatilización de los aceites esenciales, y contaminación por hongos y bacterias. La etapa más importante del procesamiento post cosecha es, sin duda, el secado. La industria utiliza plantas secas, lo cual facilita su conservación por períodos de tiempo prolongados.

El contenido de humedad de las plantas frescas varía de 60% a 80%. El proceso de secado reduce este contenido a 5 – 12%. Según el órgano de la planta, las pérdidas de peso durante el secado son, hojas 20 – 75 %, corteza 40 – 65%, tallo 30 – 70%, raíces 25 – 80%, flores: 15 – 80%.

El secado interrumpe los procesos de degradación causados por enzimas o fermentos, impide el desarrollo de microorganismo y las reacciones de oxidación y de hidrólisis. Sin embargo, como este proceso involucra calor,

pueden presentarse pérdidas de aceites esenciales y de sustancias volátiles, así como el riesgo de degradación de las sustancias termolábiles. La mayoría de las plantas medicinales pueden ser secadas a temperaturas que varían entre 30 °C y 60 °C. Las plantas que contienen aceites esenciales o sustancias volátiles deben ser secadas a temperaturas inferiores a 40°C. Debe garantizarse una buena circulación de aire para facilitar el proceso de secado.

La manera como va a ser realizado el secado debe determinarse experimentalmente para cada caso. Un secado lento puede causar alteraciones perjudiciales antes que el proceso se haya terminado, por la acción de las enzimas, los hongos y las bacterias. Un proceso de secado muy rápido endurece la capa superficial de las células e impide la evaporación del agua que está dentro del órgano lo que propicia la acción de enzimas en su interior, causa la volatilización de los aceites esenciales originando productos con una pésima presentación comercial.

El proceso de secado puede ser realizado al sol o a la sombra, extendiendo la planta en capas finas, en una superficie limpia. Sin embargo, este proceso no permite un control de la temperatura y debe interrumpirse cuando comienza a anochecer, recogiendo las plantas y guardándolas en un local cubierto, para impedir la absorción de la humedad durante la noche. Los mejores resultados se obtienen utilizando secadores solares o secadores que operan con aire caliente.

2.3.3.4. Almacenamiento

Por grandes que hayan sido los cuidados durante la recolección y el proceso de secado, las plantas pierden principios activos por degradación durante el almacenamiento. La conservación de la materia prima vegetal por

períodos prolongados de tiempo depende de las condiciones de almacenamiento; las condiciones apropiadas impiden que el producto tenga contacto con el sol, el polvo, los roedores, los insectos y otros factores de degradación impidiendo la pérdida de principios volátiles.

El material puede ser guardado en sacos de fique o en fardos prensados. El uso de sacos de plástico debe evitarse porque estos no permiten una ventilación apropiada. Los sacos deben etiquetarse y constar en la etiqueta el nombre científico de la planta y la parte usada, la fecha de ingreso, el nombre del proveedor, el origen y la aprobación dada por el control de calidad.

El lugar en donde se va a realizar el almacenamiento debe ser limpio, sin incidencia de la luz solar directa. Los empaques que contienen las materias primas no deben colocarse directamente en el suelo, deben ser colocadas en estantes. El recinto debe tener cortinas o mallas en las ventanas para impedir la entrada de insectos y el lugar debe poseer buena ventilación y baja humedad. Se debe impedir la entrada de aves y se debe eliminar sus nidos y tener precaución para no permitir la presencia de roedores.

2.3.3.5. Molienda

La molienda tiene como objetivo la disminución del tamaño de las partículas de la droga vegetal para adecuarla a la etapa siguiente del proceso de extracción.

La extracción de una droga entera o dividida en fragmentos gruesos sería incompleta, por la pobre penetración del disolvente en el tejido vegetal, y sería igualmente muy lenta, una vez que las membranas celulares actúan como verdaderas barreras que dificultan el proceso de extracción.

En el caso de la droga previamente dividida, tales membranas se encuentran parcialmente destruidas, lo que facilita la disolución de los constituyentes celulares en el líquido externo. Sin embargo, la división excesiva, con formación de polvos muy finos, puede causar problemas en el transcurso de la extracción.

Para aumentar la superficie de contacto y obtener la forma más apta de extracción, la operación preliminar a la misma es generalmente la trituración. La trituración expone más glándulas de aceite esencial crudo y reduce el grueso del material; esto permite una extracción más rápida, mayor rendimiento y mejor calidad del aceite esencial crudo, al mismo tiempo que menor consumo de disolvente.

El grado de trituración para cada planta se debe aprender por experiencia. Es claro que el material desmenuzado debe ser extraído lo más pronto posible para reducir al mínimo la pérdida de aceite esencial crudo por evaporación. Se debe emplear el seccionamiento que consiste en la división de los sólidos por medio de cortadoras y luego empleando una banda de cuchillas.

También se puede emplear el proceso de percusión cuyo efecto de rompimiento se realiza por golpes bruscos de martillos. La mayor parte del aceite esencial crudo fácilmente extraíble proviene de las células que se rompen durante los procesos de trituración, cocción, presión, y laminado, el cual es obtenido por disolución; la fracción más difícil de extraer proviene de las células enteras o parcialmente rotas y es el obtenido por difusión.

2.3.4. Análisis de la oleorresina

El análisis químico de los extractos de plantas es muy importante en el control de la calidad. Después que la identidad del material inicial ha sido establecida, la investigación cuantitativa y cualitativa puede empezarse. Este análisis debe envolver preferiblemente alguna clase de método cromatográfico. La calidad del extracto de la planta puede ser dada como una huella digital en el cromatograma (aceites esenciales crudos) en el caso de que los componentes principales no sean conocidos o demasiados complejos.

Entre las propiedades físicas que se analizan para las oleorresinas están la densidad, el índice de refracción, solubilidad entre otros.

2.3.5. Cromatografía en fase gaseosa

La cromatografía en fase gaseosa es una técnica que permite la separación de sustancias volatilizables. La separación tiene como base la distribución diferencial de las sustancias entre una fase estacionaria, sólida o líquida, y una fase móvil (gaseosa).

La muestra es introducida en una columna que contiene la fase estacionaria, a través del sistema de inyección. Temperaturas apropiadas en el sitio de la inyección y en la columna, posibilitan la volatilización de los componentes de la muestra los cuales, de acuerdo con sus propiedades y las de la fase estacionaria, son retenidos por tiempos variables y llegan al final de la columna en tiempos diferentes. Un detector adecuado, a la salida de la columna, permite la detección y la cuantificación de las sustancias.

La cromatografía en fase gaseosa es una técnica de análisis que ofrece resoluciones excelentes, con sensibilidad del orden de miligramos a

picogramos. Los resultados son cuantitativos y se obtienen en un espacio de tiempo relativamente corto. Las desventajas son: los componentes de las muestras deben ser estables a la temperatura de operación, las muestras tienen que ser volátiles; es necesario hacer un tratamiento preliminar de las muestras, lo que convierte el proceso en difícil y complejo, además que su eficacia no es muy alta, como técnica para las identificaciones cualitativas.

La salida de las sustancias de la columna es registrada bajo la forma de picos que deben ser simétricos y sin superposición. La asimetría y la sobreposición indican una separación defectuosa. Los picos asimétricos pueden indicar fallas en la inyección, un exceso de la muestra, o pérdida de la eficiencia de la fase estacionaria.

La eficiencia del proceso se mide en términos de platos teóricos (un plato teórico equivale a una etapa del equilibrio de la sustancia entre las fases). La mayor eficiencia se traduce en la obtención de picos estrechos.

2.3.6. Cromatografía líquida de alta resolución

La Cromatografía líquida de alta resolución o High performance liquid chromatography (HPLC) es un tipo de cromatografía en columna utilizada frecuentemente en bioquímica y química analítica. También se la denomina a veces Cromatografía líquida de alta presión o High pressure liquid chromatography (HPLC), aunque esta terminología se considera antigua y está en desuso. El HPLC es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

En la HPLC isocrática el compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria (normalmente, un cilindro con pequeñas partículas redondeadas con ciertas características químicas en su superficie)

mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tarda un compuesto a ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad identificativa característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro la columna y reduce así su difusión dentro la columna mejorando la resolución de la cromatografía. Los disolventes más utilizados son el agua, el metanol y el acetonitrilo. El agua puede contener tampones, sales, o compuestos como el ácido trifluoroacético, que ayudan a la separación de los compuestos.

Una mejora introducida a la técnica de HPLC descrita es la variación en la composición de la fase móvil durante el análisis, conocida como elución en gradiente. Un gradiente normal en una cromatografía de fase reversa puede empezar a un 5% de acetonitrilo y progresar de forma lineal hasta un 50% en 25 minutos. El gradiente utilizado varía en función de la hidrofobicidad del compuesto. El gradiente separa los componentes de la muestra como una función de la afinidad del compuesto por la fase móvil utilizada respecto a la afinidad por la fase estacionaria. En el ejemplo, utilizando un gradiente agua/acetonitrilo los compuestos más hidrofílicos eluirán a mayor concentración de agua, mientras que los compuestos más hidrofóbicos eluirán a concentraciones elevadas de acetonitrilo. A menudo, hace falta realizar una serie de pruebas previas por tal de optimizar el gradiente de forma que permita una buena separación de los compuestos.

2.3.6.1. Tipos de HPLC

2.3.6.1.1. Cromatografía de fase normal

La cromatografía de fase normal o "Normal phase HPLC" (NP-HPLC) fue el primer tipo de sistema HPLC utilizado en el campo de la química, y se caracteriza por separar los compuestos en base a su polaridad. Esta técnica utiliza una fase estacionaria polar y una fase móvil apolar, y se utiliza cuando el compuesto de interés es bastante polar. El compuesto polar se asocia y es retenido por la fase estacionaria. La fuerza de adsorción aumenta a medida que aumenta la polaridad del compuesto y la interacción entre el compuesto polar y la fase estacionaria polar (en comparación a la fase móvil) aumenta el tiempo de retención.

La fuerza de interacción no sólo depende de los grupos funcionales del compuesto de interés, sino también en factores estéricos de forma que los isómeros estructurales a menudo se pueden diferenciar el uno del otro. La utilización de disolventes más polares en la fase móvil disminuye el tiempo de retención de los compuestos mientras que los disolventes más hidrofóbicos tienden a aumentar el tiempo de retención.

La NP-HPLC cayó en desuso a los años setenta con el desarrollo del HPLC de fase reversa o Reversed – phase HPLC debido a la falta de reproductibilidad de los tiempos de retención puesto que los disolventes prácticos cambiaban el estado de hidratación de la sílica o alúmina de la cromatografía.

2.3.6.1.2. Cromatografía de fase reversa

La HPLC de fase reversa (RP – HPLC) consiste en una fase inmóvil apolar y una fase móvil de polaridad moderada. Una de las fases estacionarias más comunes de este tipo de cromatografía es la sílica tratada con RMe_2SiCl , dónde la R es una cadena alquil tal como $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ ó C_8H_{17} . El tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza apolar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente.

El tiempo de retención aumenta con la adición de disolvente polar a la fase móvil y disminuye con la introducción de disolventes más hidrofóbicos. La cromatografía de fase reversa es tan utilizada que a menudo se lo denomina HPLC sin ninguna especificación adicional. La cromatografía de fase reversa se basa en el principio de las interacciones hidrofóbicas que resultan de las fuerzas de repulsión entre un disolvente relativamente polar, un compuesto relativamente apolar, y una fase estacionaria apolar. La fuerza conductora en la unión del compuesto a la fase estacionaria es la disminución del área del segmento apolar del analito expuesto al disolvente. Este efecto hidrofóbico está dominado por la disminución de la energía libre de la entropía asociada con la minimización de la interfase compuesto-disolvente polar. El efecto hidrofóbico disminuye con la adición de disolvente apolar a la fase móvil. Esto modifica el coeficiente de partición de forma que el compuesto se mueve por la columna y eluye.

Las características del compuesto de interés juegan un papel muy importante en la retención. En general, un compuesto con una cadena alquil larga se asocia con un tiempo de retención mayor porque aumenta la hidrofobicidad de la molécula. Aun así, las moléculas muy grandes pueden ver reducida la interacción entre la superficie del compuesto y la fase estacionaria.

El tiempo de retención aumenta con el área de superficie hidrofóbica que suele ser inversamente proporcional al tamaño del compuesto. Los compuestos ramificados suelen eluir más rápidamente que sus isómeros lineales puesto que la superficie total se ve reducida.

Aparte de la hidrofobicidad de la fase móvil, otras modificaciones de la fase móvil pueden afectar la retención del compuesto; por ejemplo, la adición de sales inorgánicas provoca un aumento lineal en la tensión superficial, y como que la entropía de la interfase compuesto-disolvente está controlada precisamente por la tensión superficial, la adición de sales tiende a aumentar el tiempo de retención.

Otra variable importante es el pH puesto que puede cambiar la hidrofobicidad del compuesto. Por este motivo, la mayoría de métodos utilizan un tampón como el fosfato de sodio por controlar el valor del pH. Estos tampones controlan el pH, pero también neutralizan la carga o cualquiera resto de sílica de la fase estacionaria que haya quedado expuesta y actúan como contraiones que neutralizan la carga del compuesto. El efecto de los tampones sobre la cromatografía puede variar, pero en general mejoran la separación cromatográfica.

Las columnas de fase reversa se echan a perder con menor facilidad que las columnas de sílica normales. Aun así, muchas columnas de fase reversa están formadas por sílica modificada con cadenas alquil y no se deben utilizar nunca con bases en medio acuoso puesto que éstas podrían dañar el esqueleto de sílica subyacente. Las columnas se pueden utilizar en ácidos en medio acuoso pero no deberían estar expuestas demasiado tiempo al ácido porque puede corroer las partes metálicas del aparato de HPLC.

2.3.6.1.3. Cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía de exclusión molecular, también conocida como cromatografía por filtración en gel, separa las partículas de la muestra en función de su tamaño. Generalmente se trata de una cromatografía de baja resolución de forma que se suele utilizar en los pasos finales del proceso de purificación. También es muy útil para la determinación de la estructura terciaria y la estructura cuaternaria de las proteínas purificadas.

La cromatografía de filtración molecular es un método de cromatografía en columna por el cual las moléculas se separan en solución según su peso molecular, o más precisamente, según su radio de Stokes.

En esta cromatografía, la fase estacionaria consiste en largos polímeros entrecruzados que forman una red tridimensional porosa. A los fines prácticos, las columnas se empaquetan con pequeñas partículas esféricas formadas por esos polímeros entrecruzados. En consecuencia, estas partículas son porosas, y el tamaño de los poros es tal que algunas moléculas (las demasiado grandes) no podrán ingresar a esos poros, en tanto que otras (las suficientemente pequeñas) podrán pasar libremente. Los poros quedan conectados formando una malla o red, lo cual determina una serie de caminos a ser recorridos por las moléculas que acceden al interior de esta.

2.3.6.1.4. Cromatografía de intercambio iónico

En la cromatografía de intercambio iónico, la retención se basa en la atracción electrostática entre los iones en solución y las cargas inmovilizadas a la fase estacionaria. Los iones de la misma carga son excluidos mientras que los de carga opuesta son retenidos por la columna. Algunos tipos de

intercambiadores iónicos son: i) Resinas de poliestireno, ii) intercambiadores iónicos de celulosa y dextranos (geles) y iii) Sílica porosa o vidrio de tamaño de poro controlado. En general los intercambiadores iónicos favorecen la unión de iones elevada carga y radio pequeño. Un incremento en la concentración del contraión (respeto a los grupos funcionales de la resina) reduce el tiempo de retención. Un incremento en el pH reduce el tiempo de retención en las cromatografías de intercambio catiónico mientras que una disminución del pH reduce el tiempo de retención en las cromatografías de intercambio aniónico. Este tipo de cromatografía es ampliamente utilizado en las siguientes aplicaciones: purificación de agua, concentración de componentes traza, cromatografía de proteínas de intercambio iónico, etc.

2.3.6.1.5. Cromatografía basada en bioafinidad

Este tipo de cromatografía se basa en la capacidad de las sustancias biológicamente activas de formar complejos estables, específicos y reversibles. La formación de estos complejos implica la participación de fuerzas moleculares como las interacciones de Van der Waals, interacciones electrostáticas, interacciones dipolo-dipolo, interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno entre las partículas de la muestra y la fase estacionaria.

2.3.6.2. Cromatografía gas – líquido

En la cromatografía de gas líquido, se prepara una columna que contiene un soporte inerte (tubo largo) recubierto con una fase líquida estacionaria. La fase en movimiento es un gas inerte, normalmente helio, aunque a veces se usa el argón y el nitrógeno. La mezcla de muestra se introduce en al corriente de gas y, por tanto, dentro de la columna. El inyector, la columna y los detectores normalmente se calientan. El proceso de migración diferencial está

gobernado por la partición del soluto entre la fase gaseosa en movimiento y la fase líquida estacionaria. Por tanto la velocidad de transporte para un soluto a través de una columna depende de la velocidad de flujo del gas transportador, de la temperatura y de la fase líquida estacionaria. Hay un gran número de choques entre la fase en movimiento y la fase estacionaria para cada molécula de soluto, con el resultado de que aun los compuestos que son casi idénticos pueden ser separados.

La fase móvil debe tener bajo costo, ser compatible con el detector y tener alta pureza. Para dar mayor reproducibilidad al análisis, la saturación del gas debe ser constante y debe ser controlada a través de válvulas de gas. La inyección se realiza generalmente con microjeringas que contienen la muestra. El volumen inyectado no debe superar la capacidad de la columna, y entre más pequeño sea el volumen usado de la muestra mayor será la eficiencia y la reproducibilidad del análisis. La temperatura aplicada debe ser suficiente para la volatilización de la muestra.

La eficiencia de una columna para separar especies casi idénticas, se expresa en función de su AEPT (altura equivalente a un plato teórico). La AEPT para una columna en particular es la región de la columna, expresada en unidades de longitud, en la cual ocurre un equilibrio entre la fase en movimiento o gaseosa y la fase estacionaria. Mientras más pequeña sea la AEPT, la columna es más eficiente.

Los materiales más usados en una columna son el cobre, el acero, el aluminio, el vidrio y el teflón. Las columnas se clasifican en empacadas y capilares, y generalmente tienen formas de espiral, de acuerdo con el equipo. Las columnas capilares son de menor diámetro y más larga y deben poseer estabilidad de la fase estacionaria sobre la pared o soporte de la columna, además de la estabilidad fisicoquímica. Las columnas capilares son las más

utilizadas porque presentan mejor eficiencia en la separación ya que proporcionan un número mayor de platos teóricos. Estas columnas permiten la aplicación de una menor presión en el sistema. Una mayor longitud da como resultado mayor rapidez en los análisis y mejor resolución de los picos, con un menor volumen de la muestra inyectada.

Una gran variedad de detectores diferentes se usan en la cromatografía gas-líquido, aunque el más común es el detector de conductividad térmica. Los dos lados del detector, una referencia y una muestra, forman los dos brazos del puente de Wheatstone. Como sólo gas transportador está pasando a través de los dos lados, el puente se encuentra balanceado.

Con el paso adicional de algún otro gas, además del gas transportador por un lado del detector, la conductividad térmica de ese lado cambia y el puente queda fuera de balance. La señal de desbalanceo se amplifica y se alimenta a un registrador gráfico (Sharapin, 2000).

2.3.6.3. Análisis cualitativo

La identificación de la naturaleza química de los componentes de la muestra es obtenida por la comparación de los tiempos de retención de un patrón y el de la muestra, acompañadas de técnicas auxiliares, como el infrarrojo (IR), ultravioleta (UV) y visible, resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas, acopladas a la salida del detector.

La cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masa (CG – EM) permite la identificación de casi todos los compuestos en el orden de microgramos. Esta técnica asocia la separación cromatográfica en la fase gaseosa a una detección extremadamente sensible y específica de la espectrometría de masas. De esta manera, los compuestos separados por CG son transferidos al espectrómetro de masas por el gas que se disociará en

fragmentos iónicos que serán analizados de manera cualitativa. Se obtiene un espectro de masa característico de la sustancia fragmentada que permite su identificación a partir de la comparación con una base de datos espectrales. El cromatógrafo generalmente es de columna capilar para la reducción de la presión en la cámara de ionización (1 – 5 mL/min), y posee una interfase de tipo conexión directa o de divisor abierto, para la conexión de los dos sistemas, la cual tiene como función concentrar y separar las moléculas de la muestra del gas de arrastre y de la fase móvil.

La cámara de ionización funciona al calor y al vacío y la ionización de la muestra se produce por ionización química o por el impacto de electrones, llegando al sistema de detección de los iones para la interpretación de los resultados.

Algunas interfaces son de tipo de separadores moleculares, utilizados con columnas empacadas en las cuales se trabaja con presiones mayores. En este caso las moléculas de gas se desvían ya que poseen una masa menor y las moléculas de las sustancias separadas entran al sistema de vacío del espectrómetro de masas de ionización. (Sharapin, 2000)

2.4. Aceites esenciales

Se conoce con este nombre al líquido oleoso volátil, generalmente insaponificable que se obtiene de las diferentes partes de una planta, como las hojas, flores, semillas y frutos, por medio de algún método físico de extracción. Representa la fracción aromática más importante del vegetal. Está constituido por una mezcla muy compleja de compuestos, principalmente terpenos, alcoholes, cetonas, fenoles, ácidos, aldehídos y ésteres. Se solubiliza

parcialmente en etanol, en cloroformo y en aceites fijos y es insoluble en agua. (López, 2004)

Su composición y sus propiedades sensoriales varían aun en una misma planta; por ejemplo, el árbol del naranjo tiene aceites esenciales en sus flores (aceite de azahar), en sus vástagos y hojas nuevas (aceite de *petit – grain*) y en la cáscara del fruto; cada uno de ellos tiene un aroma propio y una composición diferente. En general, las plantas jóvenes contienen una mayor cantidad de aceite, pero no con el perfil tan aceptado como el de las plantas adultas.

No se conoce exactamente la función biológica del aceite esencial en el vegetal. Algunos investigadores consideran que sólo es un subproducto propio del metabolismo de la planta y que no tiene ninguna actividad o funcionalidad particular; sin embargo, otros suponen que el de las hojas y las flores sirve para atraer a los insectos y así favorecer la polinización, o que actúan como repelente contra los depredadores naturales.

2.4.1. Métodos de obtención de aceites esenciales

Los aceites esenciales se obtienen en su mayoría por destilación. Los siguientes procesos pueden ser considerados: destilación por arrastre con vapor de agua y la destilación directa con vapor de agua. Además de la destilación, los aceites esenciales pueden ser obtenidos por extracción con disolventes volátiles, extracción con fluidos supercríticos, enflorado, maceración y expresión. (Sharapin, 2000)

2.4.1.1. Destilación por arrastre con vapor de agua

Este método es uno de los más utilizados para la extracción de aceites esenciales crudos. Para extraerlos, se debe contar con un equipo de extracción de pequeñas dimensiones si se trata de una determinación experimental en laboratorio y de mayor tamaño si es una tarea a nivel industrial.

Los extractores constan de las siguientes partes: una fuente de calor que genera vapor, un recipiente para alojar la hierba con agua, un colector del aceite esencial separado y un refrigerante para los vapores. En los laboratorios se utilizan balones de 1 y 5 litros, mientras que los equipos industriales pueden llegar a tener una capacidad de hasta 8,000 ó 10,000 litros en el recipiente para colocar la hierba. El vapor de agua atraviesa la hierba colocada en el recipiente, extrae y arrastra el aceite esencial que tiene bajo punto de volatilización y lo lleva hasta el refrigerante, donde al enfriarse se condensa y se separa el agua del aceite por densidad. Si el aceite es menos denso queda en la superficie y si es más denso que el agua, va al fondo. De esta manera es fácil separarlo. Coobación es el proceso mediante el cual el agua condensada regresa al proceso, después de ser separada del aceite. El retorno del agua condensada tiene por objeto minimizar las pérdidas de componentes polares, principalmente de los fenoles, disueltos en el agua. Sin embargo, la permanencia de componentes solubles en el agua durante más tiempo da como resultado una mayor posibilidad de hidrólisis o la descomposición térmica, principalmente en el caso de la destilación con agua.

2.4.1.2. Destilación con vapor

Este proceso es similar al anterior, con la única diferencia de no existir agua en el fondo del recipiente. El vapor de agua, saturado o sobrecalentado, y

frecuentemente a una mayor presión que la atmosférica, es introducido atravesando el material colocado sobre un soporte. La gran ventaja de este proceso consiste en que la cantidad de vapor de agua puede ser controlada.

El proceso de destilación con vapor da como resultado riesgos menores de degradación térmica y constituye el proceso más utilizado por la industria de aceites esenciales, principalmente cuando se trata de la producción de aceites esenciales para la fabricación de perfumes.

2.4.1.3. Extracción con disolventes volátiles

Este método es utilizado para muchos tipos de flores en varios países. Está basado en el hecho de que los disolventes volátiles penetran rápidamente en los pétalos y disuelven, con las ceras y algunas materias colorantes, casi todas las sustancias odoríferas naturales.

En este método la muestra seca y molida se pone en contacto con disolventes tales como alcohol, cloroformo, etc. Estos disolventes solubilizan la esencia pero también solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas y ceras, obteniéndose al final una esencia impura.

La eliminación del disolvente a baja temperatura da un aceite concentrado, semisólido, llamado concreto. Este producto puede ser tratado con alcohol de gran concentración, en el cual no son solubles la parte de las ceras; después de la refrigeración, para eliminar la mayor cantidad posible de cera disuelta, la solución alcohólica se concentra a presión reducida para obtener un absoluto sin alcohol.

Si el procedimiento se hace en frío a temperatura menor a 50 °C el aceite llevará el nombre de aceite virgen, si la temperatura es mayor a 50 °C los ácidos grasos se envician.

Entre los equipos utilizados para la extracción con disolventes es el Soxhlet, el cual es un equipo de extracción semicontinua, donde una de las fases, el sustrato, se agrega sola al principio mientras que el disolvente de extracción cumple un ciclo de extracción y purificación continua. La purificación se realiza en forma paralela por destilación del disolvente, de manera que el sustrato siempre está en contacto con el disolvente puro.

Se utiliza a escala de laboratorio pues a nivel industrial resulta costoso por el valor comercial de los disolventes, porque se obtienen esencias impurificadas con otras sustancias, y además por el riesgo de explosión o incendio de muchos disolventes orgánicos volátiles.

2.4.1.4. Extracción con fluidos supercríticos

Este método es de desarrollo más reciente. El material vegetal cortado en trozos pequeños, licuado o molido, se empaca en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un líquido supercrítico (por ejemplo dióxido de carbono líquido), las esencias son así solubilizadas y arrastradas y el líquido supercrítico que actúa como disolvente extractor y se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente, y finalmente se obtiene una esencia pura.

Aunque presenta varias ventajas como rendimiento alto, es ecológicamente compatible, el disolvente se elimina fácilmente e inclusive se puede reciclar, y las bajas temperaturas utilizadas para la extracción no

cambian químicamente los componentes de la esencia, sin embargo el equipo requerido es relativamente costoso, ya que se requieren bombas de alta presión y sistemas de extracción también resistentes a las altas presiones.

2.4.1.5. Enflorado

En el método de enflorado o enfleurage, el material vegetal (generalmente flores) es puesto en contacto con un aceite vegetal. La esencia es solubilizada en el aceite vegetal que actúa como vehículo extractor. El método de extracción con grasa fría es muy sencillo y consiste en poner en contacto las flores con una capa delgada de grasa dentro de cámaras pequeñas. Al desprenderse el perfume de las flores, se fija en la grasa, debido a su gran afinidad, y después de renovar varias veces las flores se dejan los pétalos 24 horas sobre la grasa (cuerpo).

Pasado 60 días aproximadamente, al final del período de recolección, la grasa (que no ha sido renovada) llega a estar saturada con el aceite de la flor. La extracción alcohólica de la grasa olorosa, llamada pomada, da una solución llamada extracto; eliminando el alcohol por destilación.

También puede efectuarse el enflorado sobre carbón, no se diferencia nada el procedimiento; otro sistema de enflorado consiste en usar paños de tela muy absorbentes, de algodón impregnados de aceite; después se exprimen los paños y se obtiene un aceite perfumado, tanto el aceite como la grasa que se usan, deben de ser previamente purificados y desodorizados.

Esta técnica es empleada para la obtención de esencias florales (rosa, jazmín, azahar, etc.) pero su bajo rendimiento y la difícil separación del aceite extractor la hacen costosa. Este método es llevado a la práctica sólo en países

de Europa, es restringido a las flores que después de cortadas continúan su actividad fisiológica formando y emitiendo perfume.

2.4.1.6. Maceración

La maceración se asemeja a la extracción por disolventes, la diferencia es que el material permanece varios días sumergido; en este sistema se usa aceite, grasa fundida, y aún alcohol etílico. El proceso clásico de maceración consiste en dejar la droga en contacto con el disolvente durante varios días, con agitación ocasional. Este proceso, también conocido como maceración simple o estática, es sumamente lento.

Para abreviar el tiempo de operación, la droga y el disolvente deben mantenerse en movimiento constante. Este procedimiento es conocido como maceración dinámica.

Tanto la maceración simple como la maceración dinámica pueden ser ejecutadas a una temperatura ambiente o a temperaturas elevadas. En este último caso el procedimiento es conocido como digestión. La maceración fue un proceso importante antes de la introducción de los métodos modernos de extracción con disolventes volátiles.

2.4.1.7. Expresión

En este método la finalidad es exprimir por máquinas o a mano el fruto o la planta, produciendo la misma calidad y cantidad del aceite y es el método aplicado en forma comercial. De los procesos de exprimir a mano, el proceso de esponja es el más importante, ya que produce el aceite de mayor calidad. Aquí la fruta se parte, y la piel se moja y se sumerge por varias horas; cada cáscara

se prensa contra una esponja y el aceite se absorbe en ella, que se exprime periódicamente. Una persona puede preparar sólo 680 gramos de aceite de limón por día siguiendo este método, aún se practica, especialmente en Sicilia. Este método de extracción está prácticamente limitado a los aceites obtenidos de frutas cítricas. (Sharapin, 2000)

2.4.2. Aceites encapsulados

Microencapsulación es el término usual y la técnica aplicada a la encapsulación de los aceites esenciales de especies. Estos son preparados por medio de una emulsión del aceite esencial con alguno de los almidones modificados, desarrollados para tal propósito, o en gomas solubles tal como la goma acacia, y luego el producto emulsificado es secado en condiciones de humedad y temperatura controladas. El almidón o goma deben de ser de grado alimenticio si el producto encapsulado va a ser utilizado para fines alimenticios; debe de ser también soluble en agua para permitir que el sabor sea liberado uniformemente en el producto en el cual sea utilizado el aceite encapsulado. El tamaño de partícula promedio debe de ser uniforme y aproximadamente igual al tamaño de partícula de la sal fina o dextrosa para permitir una distribución uniforme en una mezcla seca de saborizantes y así evitar una separación de los demás ingredientes granulados durante las operaciones de mezclado, llenado o transporte. (Badui, 1993)

2.4.3. Especies solubles secas y líquidas

La mayoría de las especies son secas; también existen otras dos presentaciones que tienen aplicaciones limitadas. Especies saborizantes líquidos solubles, son mezclas simples de aceites esenciales y oleorresinas, diluidas a cierta intensidad de sabor con la adición de un solvente compatible como el propilenglicol o el glicerol. Polisorbato 80 es añadido para hacerlos solubles en agua, y si se desea una emulsión, una goma es añadida como

vehículo. El solvente es el factor limitante probable en el uso de este tipo de especie soluble que es utilizada principalmente para salmueras y sopas enlatadas.

El otro tipo de especie soluble es conocido como especie soluble en base grasosa. Su nombre se debe a que los aceites y las oleorresinas son mezclados con ambos líquidos o aceites vegetales disueltos. Estas especies son diseñadas para productos con fase grasosa como la mayonesa o alguna mezcla de sopa instantánea especial. Algunos panaderos le aplican atomizando esta especie al producto recién horneado para darle brillo y sabor. El tipo de especie soluble más común conocido en los registros como una especie seca soluble. (Badui, 1993)

2.5. Ventajas y desventajas de varios tipos de especies

2.5.1. Especies frescas

2.5.1.1. Ventajas

- Liberación lenta del sabor en procesos de alta temperatura
- Fáciles de pesar y manejar.
- No hay problemas en su identificación

2.5.1.2. Desventajas

- Grandes cantidades en peso están desprovistas de aroma y sabor.
- Calidad e intensidad de sabor variable, dependiendo de la edad, fuente y condiciones de almacenaje.
- La presencia de taninos puede decolorar algunos productos ya manufacturados.

- Las hierbas de las especies ya secas pierden aroma y sabor.
- La presencia de enzimas de lipasa puede afectar el sabor de productos en almacenaje.
- Fácilmente adulterables con material extraño o con especies de calidad inferior.
- Sujetos de contaminación en la fuente, en el transporte y en el almacenaje.
- Se necesitan grandes espacios en bodega para su almacenaje.
- La bodega, planta y oficinas se contaminan con polvillo de la especie durante la operación de molienda.
- Algunas especies presentan recuentos de bacterias extremadamente altos.
- Las especies molidas contribuyen negativamente en las especificaciones del producto terminado.
- Distribución pobre del sabor en algunos productos terminados.
- Incluso las especies “esterilizadas” contienen restos de insectos muertos, larvas o huevos.

2.5.2. Aceites esenciales de especies

2.5.2.1. Ventajas

- Sabor estandarizado y uniforme consistente con el de la materia prima original.
- Libre de enzimas, taninos, bacterias y suciedad.
- No contribuye con humedad en el producto final
- No contribuye significativamente con color en el producto final.

- Presentan buena estabilidad bajo condiciones normales de almacenaje.

2.5.2.2. Desventajas

- Pérdida de compuestos volátiles en procesos de altas temperaturas.
- El sabor y aroma no son completamente típicos de la especie original.
- Fácilmente adulterables.
- Algunos aceites son fácilmente oxidables.
- Los antioxidantes naturales se han eliminados durante su procesamiento.
- No son fácilmente dispersables en medios secos comestibles.
- Muy concentrados, haciéndolos difíciles de manejar y pesar con exactitud.

2.5.3. Oleorresinas de especies

2.5.3.1. Ventajas

- Sabor completo, uniforme, y estandarizado, equivalente al de la especie original.
- Higiénico, libre de bacteria, suciedades, y otros contaminantes
- Libre de enzimas, contiene antioxidantes naturales.
- Más completo, sabor de cuerpo completo en comparación con el aceite esencial equivalente.
- Aproximadamente 50% más bajo en precio que la especie original, basando el precio en costo de sabor.

- Bajo contenido de humedad, relativamente insignificante.
- Vida útil prolongada en condiciones normales y semi adversas de almacenaje.
- Minimización de la volatilidad de aceites esenciales gracias a la presencia de resinas.
- Requerimientos de menor espacio en bodega comparados con los necesarios para almacenar cantidades equivalentes de especie natural.

2.5.3.2. Desventajas

- Concentraciones muy altas y en algunas ocasiones muy viscosas, haciéndolas difíciles de pesar con exactitud.
- Debido a su naturaleza viscosa, parte del material queda en los recipientes que los contienen y subsecuentemente es perdido.
- El sabor se ve afectado según la fuente y calidad de la materia prima si esta no proviene de la misma fuente que la especie que se quiere sustituir.
- Algunos taninos están presentes a menos de que se trate el material para removerlos.
- Existe la posibilidad de contaminación por solventes a menos de que se lleve un buen control en donde se manufacturen.
- Todas las oleorresinas no tienen la misma viscosidad y cada una debe de ser manejada de forma diferente para evitar grumos en los saborizantes donde se utilicen.

2.5.4. Acuarresinas

2.5.4.1. Ventajas

- Sabor uniforme y estandarizado, similar al de la fuente de donde se obtuvo.
- Libre de taninos, enzimas y bacterias.
- Contenido de humedad relativamente bajo.
- Sabor completo comparado con el de la especie de donde se obtuvo.
- Se adapta mejor en sazonadores líquidos.
- Menos viscosos que algunas oleorresinas; generalmente, de viscosidad uniforme aunque sea de diferente especie.
- Totalmente compatible con todas las acuarresinas
- Más fácil de pesar y manejar que algunas oleorresinas.
- Fácilmente dispersables en agua, jarabes y salmueras

2.5.4.2. Desventajas

- Equivalentes con la especie 50% menor que las oleorresinas. Por lo tanto, su costo por libra de sabor es más elevado.
- Existe la posibilidad de contaminación con solventes, a menos de que se lleve un control muy cuidadoso.
- Algunos taninos pueden estar presentes a menos de que se trate el material para removerlos
- El sabor se ve afectado según la fuente de la materia prima y de la calidad de esta.

2.5.5. Aceites esenciales u oleorresinas encapsuladas

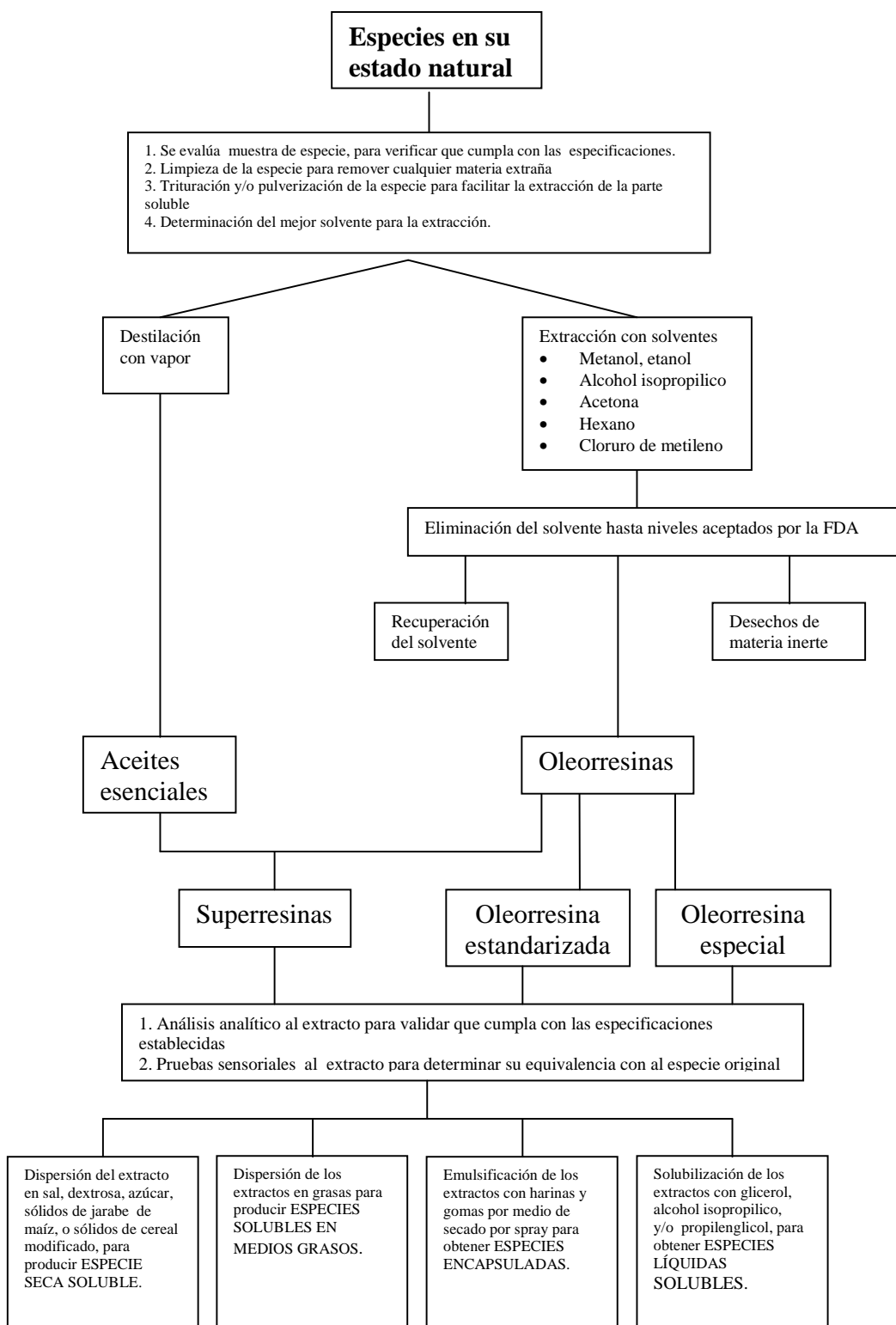
2.5.5.1. Ventajas

- El sabor está protegido de pérdidas, en períodos de almacenamiento prolongados.
- Fluyen libremente y son fáciles de pesar, manejar y mezclar.
- Libres de enzimas, taninos y bacterias.
- Fácilmente incorporables en mezclas secas.
- Libres de sal, dextrosas, y otros medios, a excepción de los almidones y/o gomas utilizados para la encapsulación de aceites u oleorresinas.
- No son higroscópicos, presentan buena estabilidad en almacenaje.

2.5.5.2. Desventajas

- Son muy costosos, contienen solamente alrededor de 20% de aceite esencial u oleorresina, por lo tanto es solamente 20% de potente en sabor.
- No apropiado para productos líquidos u horneados.
- Puede resultar un efecto de separación de la mezcla si los ingredientes no son del mismo tamaño de partícula.

Figura 1. Oleorresinas y especies solubles obtenidas de especies frescas



3. METODOLOGÍA

3.1. Localización

La parte experimental de la investigación se realizó en las siguientes instalaciones:

- 1.Laboratorio de la Sección de Química Industrial del Centro de Investigaciones de la Facultad de Ingeniería.
- 2.Departamento de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

3.2. Recursos humanos

Investigador: Br. Keny Abdón López Salazar
Asesora: Ingeniera Telma Maricela Cano Morales

3.3. Obtención de las muestras

Las hojas de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.) se obtuvieron de las montañas de la Finca Chichabac, en el municipio de Tecpán, departamento de Chimaltenango.

Tecpán Guatemala pertenece al departamento de Chimaltenango, y está ubicada en la cordillera de los Andes, dentro del Altiplano Central de la

República, tiene una extensión territorial de 201 km². Está situado a 88 kilómetros de distancia de la Ciudad de Guatemala. Se ubica a unos 2,286 metros sobre el nivel del mar con coordenadas 14° 45' 39" N, 90° 59' 54" O. Su clima es de templado a frío, llegando a tener temperaturas entre los 10 y 23 °C. Colinda al norte de Joyabaj (Quiché), al este con Santa Apolonia y Comalapa (Chimaltenango), al sur con Santa Cruz Balanza y Patzún (Chimaltenango), al oeste con Chichicastenango (Quiché), y San Andrés Semetabaj y San Antonio Palopó (Sololá), entronca con la carretera interamericana "CA - 1" aproximadamente a ½ km.

Se colectaron todas las hojas de arbustos en general y se colocaron en recipientes apropiados, para luego ser llevados hacia el secador solar de bandejas, controlándose la humedad relativa y el tiempo de secado. Las hojas secas se molieron en un molino de cuchillas y se sometieron al proceso de lixiviación utilizando el método de maceración dinámica a nivel laboratorio.

3.4. Diseño de tratamientos

Para la evaluación estadística se utilizó un diseño completamente al azar con un arreglo combinatorio, en el cual se aplicó un experimento factorial sobre la especie de estudio evaluando y utilizando el proceso de lixiviación a tres concentraciones del solvente (95%, 70% y 35% v/v) para determinar a que concentración se obtuvieron mejores resultados; se utilizó un tamaño de partícula que pase el tamiz No. 5 (4 mm) y sea retenido por un tamiz No. 200 (75 µm). Se realizaron 3 extracciones a cada concentración con 3 repeticiones para cada solvente resultando 9 unidades experimentales.

El solvente utilizado fue etanol (95%) debido a que los metabolitos (linalool, terpineol, cineol) no son miscibles con el agua y con la variación de las

concentraciones antes mencionadas se pretendió saber cual era la mejor opción para la extracción de la oleoresina (López, 2004). El tamaño del tratamiento de lixiviación en función de la relación hoja seca/solvente fue de 1:10 (w/v) debido a que relaciones con menor cantidad de solvente no cubren en su totalidad a la materia prima con lo cual no se crea una humectación total de la misma, a la vez que no permitía la agitación constante de la solución; para esto se utilizó una relación de diámetro de agitador (d_a) y diámetro de tanque (d_t) de 1:2.5 (Treybal, 1993).

El tiempo de extracción fue de 3 horas ya que en base a la experimentación con un equipo soxhlet se llegó a la conclusión que se tiene la misma cantidad de ciclos durante un tiempo de 3 y 4 horas con lo cual al obtener el rendimiento se tuvo una variación no mayor al 0.01% con lo cual se optó por el menor tiempo debido a que se genera menor consumo de energía.

El proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente debido a que los principios activos son termolábiles y pueden ser destruidos, total o parcialmente a temperaturas elevadas (mayor a 40 °C). A manera de resumen las variables de control del proceso extractivo son: el tamaño de partícula, la agitación, la temperatura, concentración del solvente y el tiempo de extracción. (Sharapin, 2000)

Obtenidos los extractos se procedió a realizarles los análisis fisicoquímicos correspondientes y cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM).

3.5. Metodología experimental

3.5.1. Materiales y equipo utilizados en la experimentación

3.5.1.1. Materia prima

Hojas de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.) molida con tamaño de partícula de 4 milímetros (tamiz No. 5).

3.5.1.2. Cristalería

Balones (100 mL)

Matraces de cuello corto con esmeril 24/40 (1 L)

Varillas de agitación

Probetas graduadas (100 mL)

Agitador magnético

Beacker (50 mL, 100 mL)

Kitasato

Embudo Buchner

3.5.1.3. Equipo

Plancha de calentamiento

Marca: CORNING

Modelo: PC-620

Voltaje: 120 V

Frecuencia: 60 Hz.

Potencia: 1113 W.

Hecha en Estados Unidos



Figura 2. Plancha de calentamiento

Bomba de vacío

Marca: Gast

Modelo: O523-VAFG588DX

Voltaje: 100 -115 V

Frecuencia: 50 Hz.

Potencia: ¼ Hp.

Revoluciones: 1725/1425 rpm

Hecha en Michigan, Estados Unidos



Figura 3. Bomba de vacío

Balanza

Marca: Adventurer

Serie: G1231202040133

Voltaje: 8 -14.5 V

Frecuencia: 50/60 Hz.

Máxima Capacidad: 150 g.

Lectura Mínima: 0.001 g

Hecha en Estados Unidos



Figura 4. Balanza

Refrigeradora

Marca: Daewoo

Modelo: FR-147RV

Voltaje: 115 - 120 V

Frecuencia: 60 Hz.

Amperaje 1.1 A

Refrigerante: R-134^a

Hecha en Korea



Figura 5. Refrigeradora

Rotavapor

Marca: Büchi

Modelo: R-200

No. Fabricación: 414191030002

Voltaje: 120 V

Frecuencia: 50/60 Hz.

Potencia: 120 W

Hecho en Flawil, Suiza.



Figura 6. Rotavapor

3.5.1.4. Reactivos

Etanol 95% grado industrial marca Merck

Agua desmineralizada marca Salvavidas

3.5.2. Método de extracción de oleorresina a nivel laboratorio

Se utilizaron hojas secadas en un secador solar. La relación hoja seca y solvente fue de 1:10 (w/v). Se procedió a reducir las de tamaño por medio de trituración con un molino de cuchillas hasta llegar a obtener 50 gramos con un tamaño de partícula que pase un tamiz No. 5 (4 mm) hasta las partículas que sean retenidas por un tamiz No. 200 (75 μ m). Este material ya seco y triturado se colocó durante 3 horas en un equipo de lixiviación dinámica que se formó de la siguiente manera: un matraz de 1000 mililitros, un agitador magnético de 3 pulgadas y una plancha de calentamiento que se reguló a 500 rpm. Luego se filtró al vacío (20 pulgadas de mercurio) la solución y se colocó en un balón con boca esmerilada 24/40 para rotaevaporar la muestra. Para llevar a cabo esta operación se alimentó con agua fría (10° – 15° C) el rotavapor y se hizo baño de María a la muestra a temperaturas menores a 60 °C, separando y

recuperando de esta forma el solvente del producto deseado ya en forma concentrada realizándola a un vacío de 20 pulgadas de mercurio. Al finalizar la destilación al vacío se recogió el producto en frascos color ámbar. Este procedimiento se repitió para cada uno de los experimentos.

3.5.3. Métodos para la caracterización de la oleorresina, determinación de las propiedades fisicoquímicas de los extractos

3.5.3.1. Determinación de densidad

La determinación de la densidad de los extractos se realizó con un picnómetro de 10 mL a temperatura de 20 °C.

3.5.3.2. Determinación del índice de refracción

Se utilizó un refractómetro Abbe. Se limpió con Xilol y se vertió una gota del extracto en el prisma, tomando nota de la lectura del equipo a temperatura de 20 °C.

3.5.3.3. Análisis cromatográfico

Las muestras a caracterizar se colocaron en recipientes limpios, herméticamente sellados, color ámbar de 5 mL para evitar su descomposición, y fueron analizadas al Departamento de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala donde se les realizó el análisis químico por medio de cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas.

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En el presente trabajo se realizó un análisis estadístico de varianza, con la finalidad de comprobar que hipótesis estadística es la que mejor se ajusta a la parte experimental del estudio, ya sea, la hipótesis nula o la hipótesis alternativa planteada según sea el caso.

La idea de este método es expresar una medida de la variación total de un conjunto de datos como una suma de términos, que se pueden atribuir a fuentes o causas específicas de variación; en su forma más simple, se aplica a experimentos que se planifican como diseños completamente aleatorios. (Walpole, 1999)

El análisis de varianza tendrá entonces que tomar en cuenta los siguientes factores:

- a) Porcentaje de etanol/agua
- b) El numero de extracciones

En la práctica se suele utilizar la tabla de organización de datos y la tabla de análisis de varianza (ANDEVA) representada por lo siguiente:

Tabla I. Organización de datos de ANDEVA

Tratamientos	1	2	3	
Repeticiones				
1	Y11	Y21	Y31	
2	Y12	Y22	Y32	
3	Y13	Y23	Y33	
Total	T1*	T2*	T3*	T**

Fuente: Walpole, 1999.

Tabla II. ANDEVA

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F calculada	F tabulada
Tratamientos	k-1	SSA	$S_1^2 = \frac{SSA}{k-1}$	$\frac{S_1^2}{S^2}$	
Error	k(n - 1)	SSE	$S^2 = \frac{SSE}{k(n-1)}$		
Total	nk - 1	SST			

Fuente: Walpole, 1999

En donde k representa el número de tratamientos y n el número de experimentos por cada tratamiento.

Las formulas empleadas descritas con letras mayúsculas arriba son las siguientes:

$$FC = \frac{T^{**2}}{k \times n} \quad [Ec. No. 1]$$

$$SSA = \sum_{i=1}^k \frac{T_i^2}{n_i} - FC \quad [Ec. No. 2]$$

$$SST = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} Y_{ij}^2 - FC \quad [Ec. No. 3]$$

$$SSE = SST - SSA \quad [Ec. No. 4]$$

$$S_1^2 = \frac{SSA}{k-1} \quad [Ec. No. 5]$$

$$S^2 = \frac{SSE}{k(n-1)} \quad [Ec. No. 6]$$

Y la regla de decisión:

Si F calculada > F tabulada se rechaza H_0

Si F calculada \leq F tabulada se acepta H_0

F tabulada:

Tabla de F con nivel de confianza del 95 %, $F(v_1, v_2)$

Donde:

$$v_1 = k(n-1) \quad [Ec. No. 7]$$

$$v_2 = n-1 \quad [Ec. No. 8]$$

4.1. Rendimientos de los extractos de oleorresina de cada una de las concentraciones utilizadas.

Tabla III. Organización de datos ANDEVA de rendimientos de los extractos de oleorresina de cada una de las concentraciones utilizadas.

Tratamientos Repeticiones	Etanol 35%	Etanol 70%	Etanol 95%	
1	11.09	15.47	22.03	
2	10.79	14.96	21.53	
3	10.66	15.72	19.54	
Total	32.54	46.15	63.10	141.80

Fuente: Datos Calculados

Hipótesis:

Ho: El porcentaje de rendimiento de la oleorresina de laurel, *Litsea guatemalensis* Mez., extraído por lixiviación mediante el método de maceración dinámica no se ve afectado significativamente por la concentración del solvente.

H₁: El porcentaje de rendimiento de la oleorresina de laurel, *Litsea guatemalensis* Mez., extraído por lixiviación mediante el método de maceración dinámica se ve afectado significativamente por la concentración del solvente.

Tabla IV. ANDEVA de rendimientos de los extractos de oleorresina de cada una de las concentraciones utilizadas.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F Calculada	F Tabulada	Probabilidad
Tratamientos	156.27	2.00	78.13	120.99	5.14	1.4164E-05
Error	3.87	6.00	0.65			
Total	160.14	8.00				

Fuente: Análisis estadístico (Programa PHSTAT)

F calculada > F tabulada se rechaza H₀

4.2. Propiedades fisicoquímicas de los extractos de oleorresina de cada una de las concentraciones utilizadas.

4.2.1. Densidad de los extractos de oleorresina.

Tabla IV. Organización de datos ANDEVA de densidad de los extractos de oleorresina.

Tratamientos Repeticiones	Etanol 35%	Etanol 70%	Etanol 95%	
1	0.962	0.881	0.834	
2	0.956	0.879	0.841	
3	0.959	0.871	0.839	
Total	2.877	2.631	2.514	8.022

Fuente: Datos Calculados

Hipótesis:

H₀: La densidad de la oleorresina de laurel, *Litsea guatemalensis* Mez., extraído por lixiviación mediante el método de maceración dinámica no se ve afectado significativamente por la concentración del solvente.

H₁: La densidad de la oleorresina de laurel, *Litsea guatemalensis* Mez., extraído por lixiviación mediante el método de maceración dinámica se ve afectado significativamente por la concentración del solvente.

Tabla V. ANDEVA de densidad de los extractos de oleorresina.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F Calculada	F Tabulada	Probabilidad
Tratamientos	0.02289	2.00	0.01144	686.58	5.14	8.23398E-08
Error	0.00010	6.00	0.00002			
Total	0.02299	8.00				

Fuente: Análisis estadístico (Programa PHSTAT)

F calculada > F tabulada se rechaza H₀

4.2.2. Índice de refracción de los extractos de oleorresina.

Tabla VI. Organización de datos ANDEVA del índice de refracción de los extractos de oleorresina.

Tratamientos Repeticiones	Etanol 35%	Etanol 70%	Etanol 95%	
1	1.483	1.499	1.519	
2	1.481	1.509	1.520	
3	1.476	1.501	1.521	
Total	4.440	4.509	4.560	13.509

Fuente: Datos Calculados

Hipótesis:

H₀: El índice de refracción de la oleorresina de laurel, *Litsea guatemalensis* Mez., extraído por lixiviación mediante el método de maceración dinámica no se ve afectado significativamente por la concentración del solvente.

H₁: El índice de refracción de la oleorresina de laurel, *Litsea guatemalensis* Mez., extraído por lixiviación mediante el método de maceración dinámica se ve afectado significativamente por la concentración del solvente.

Tabla VII. ANDEVA del índice de refracción de los extractos de oleorresina.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F Calculada	F Tabulada	Probabilidad
Tratamientos	0.00242	2.00	0.001209	86.36	5.14	3.78422E-05
Error	0.00008	6.00	0.000014			
Total	0.00250	8.00				

Fuente: Análisis estadístico (Programa PHSTAT)

F calculada > F tabulada se rechaza H₀

4.2.3. Separación de medias

Cuando el análisis de varianza presenta efecto significativo entre tratamientos se realiza una prueba de medias para saber que tratamientos son diferentes. Las más importantes son:

- a. Diferencia mínima significativa
- b. Prueba de Tukey - Kramer
- c. Prueba de Scheffe

En el análisis de varianza de un factor, un valor F significativo indica que no todas las condiciones tienen el mismo efecto sobre la variable dependiente. Sin embargo en la práctica el análisis no se detiene en este punto. Lo usual es que también se quiera determinar cuál de las condiciones difiere de las demás. Para determinar cuáles son las condiciones que difieren entre sí, por lo general se realizan varias comparaciones entre las parejas de medias de grupo.

5. RESULTADOS

Tabla VIII. Rendimiento porcentual de oleorresina de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.)

Solución Extractora	No.	Peso neto oleorresina (g)	Rendimiento (%)	Promedio (%)
Etanol 35%	1	5.55	11.09	10.85 +/- 0.2199
	2	5.39	10.79	
	3	5.33	10.66	
Etanol 70%	1	7.74	15.47	15.38 +/- 0.2235
	2	7.48	14.96	
	3	7.86	15.72	
Etanol 95%	1	11.02	22.03	21.03 +/- 1.3187
	2	10.77	21.53	
	3	9.77	19.54	

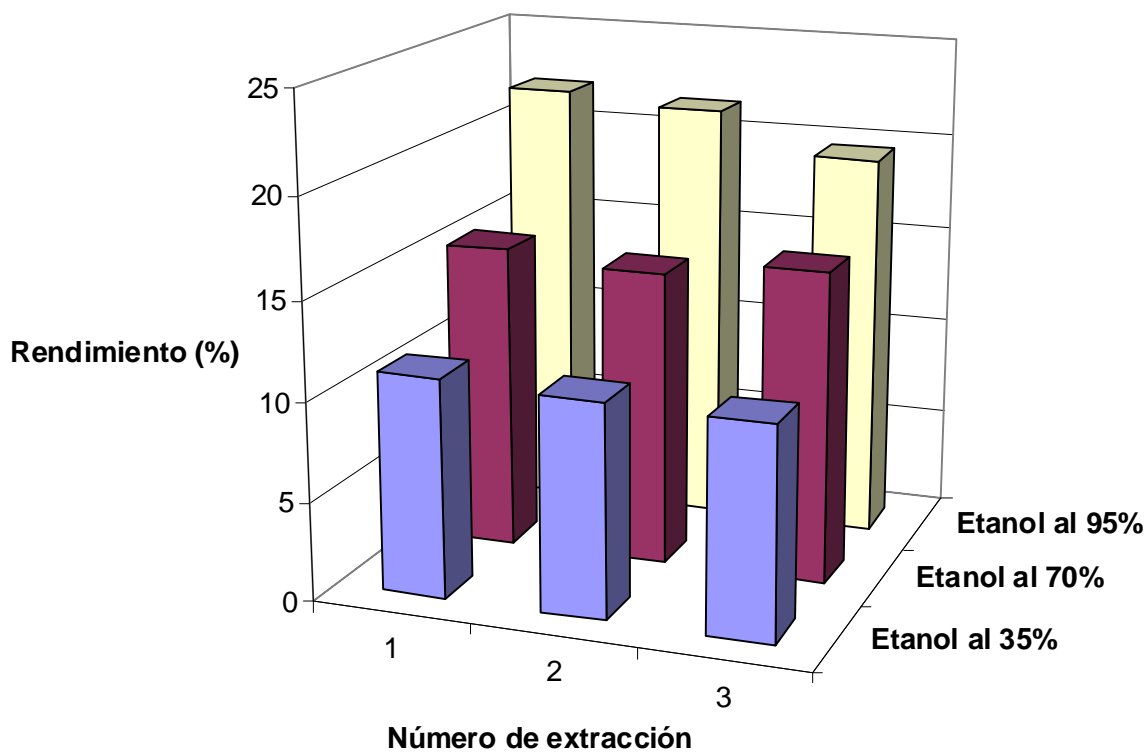
Fuente: Datos Calculados

Tabla IX. Propiedades fisicoquímicas de los extractos etanólicos de la hoja de laurel a 20 °C (*Litsea guatemalensis* Mez.)

Solución Extractora	No.	Densidad (g/mL)	Promedio (g/mL)	Índice de refracción	Promedio
Etanol 35%	1	0.962	0.959 +/- 0.0030	1.483	1.480 +/- 0.0036
	2	0.956		1.481	
	3	0.959		1.476	
Etanol 70%	1	0.881	0.877 +/- 0.0053	1.499	1.503 +/- 0.0053
	2	0.879		1.509	
	3	0.871		1.501	
Etanol 95%	1	0.834	0.838 +/- 0.0036	1.519	1.520 +/- 0.0010
	2	0.841		1.520	
	3	0.839		1.521	

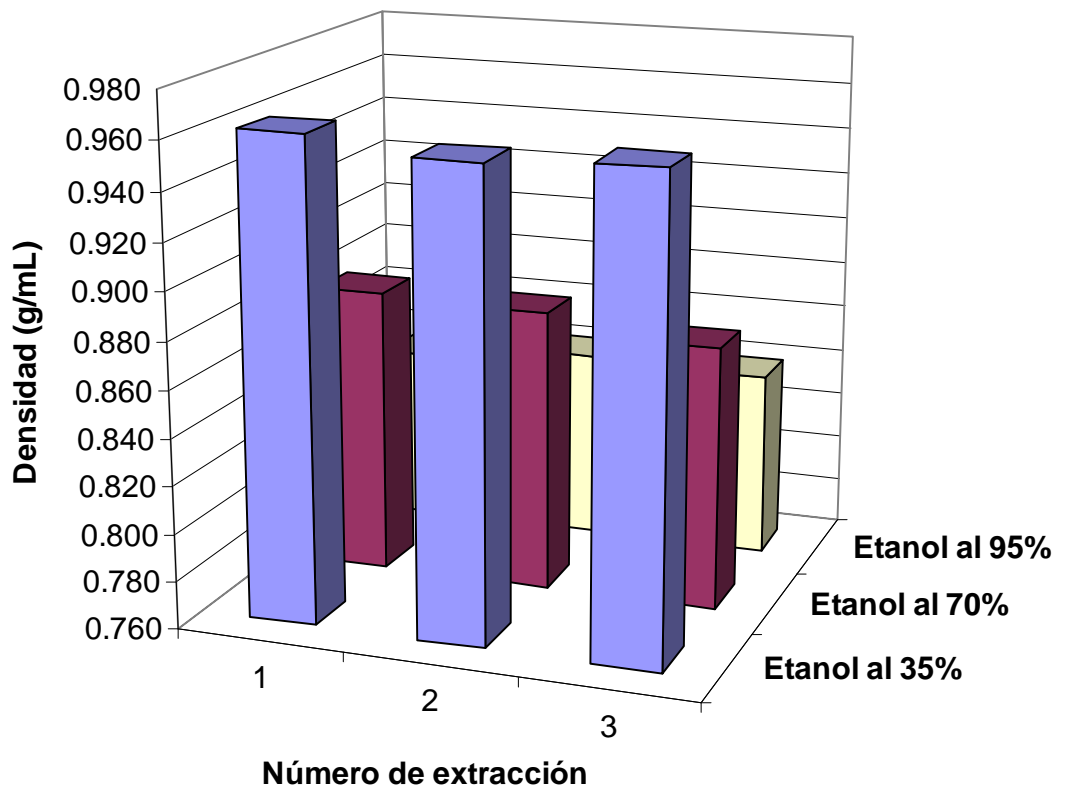
Fuente: Datos Calculados

Figura 7. Porcentaje de rendimiento de la oleorresina de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.) en función de la solución extractora



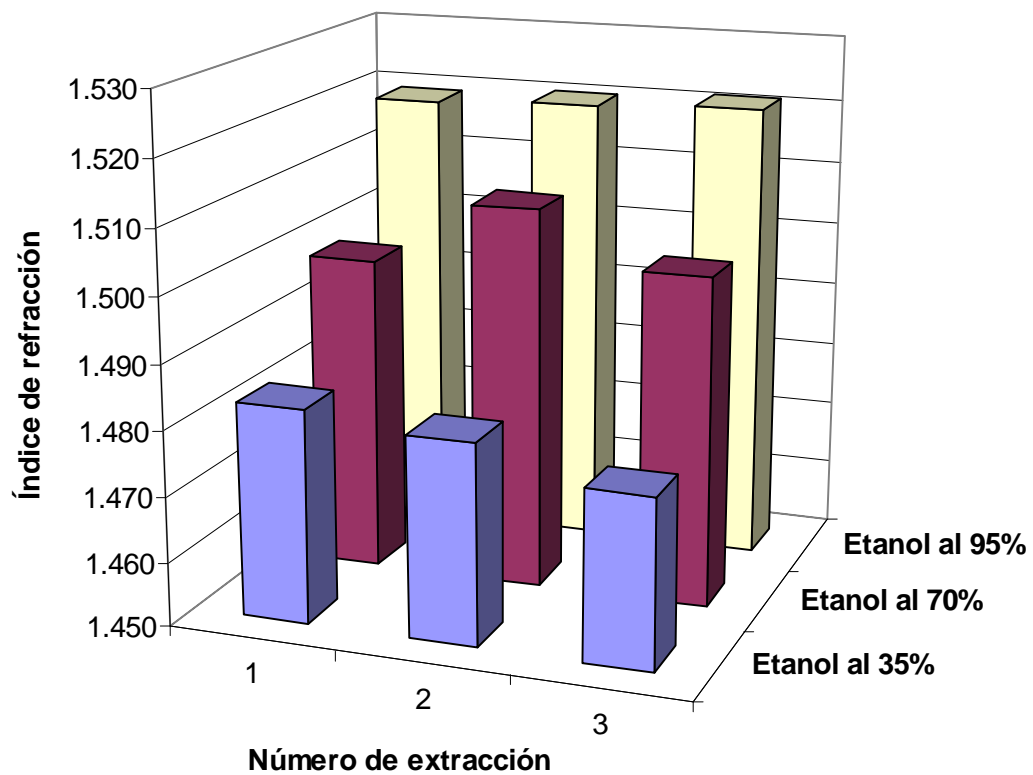
Fuente: Tabla VIII

Figura 8. Densidad a 20 °C de los extractos etanólicos de la hoja de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.) en función de la solución extractora



Fuente: Tabla IX

Figura 9. Índice de refracción a 20 °C de los extra ctos etanólicos de la hoja de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.) en función de la solución extractora



Fuente: Tabla IX

Tabla X. Síntesis del análisis de cromatografía de gas acoplada con espectrometría de masa (CG – EM) de oleorresina de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.)

No.	Componente	No. CAS	Área (%)								
			Etanol 35%			Etanol 70%			Etanol 95%		
			1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	1, 8 – Cineol	470-82-6				0.90	1.09	1.45	12.56	13.98	15.50
2	Linalool	78-70-6				1.90	2.90	2.30	20.98	21.34	23.00
3	(Z) – nerolidol	7212-44-4							17.95	12.34	9.82
4	Terpinen-4-ol	562-74-3				0.80			3.68		3.18
5	Trans-dihidrocarvona	5948-04-9					1.23		12.32	14.33	11.20
6	α -terpineol	98-55-5							0.20	0.40	0.70
7	α Thujone (Tuyona)	546-80-5	5.34	5.10	4.23	3.82	9.61	5.43	3.46	12.07	1.02
8	β Thujone (Tuyona)	471-15-8	5.34	5.10	4.23	3.82	9.61	5.43	3.46	12.07	1.02
9	n-Tetradecano	629-59-4	2.40		1.23				5.68	6.34	7.23
10	Acetanilida	103-84-4		4.15		7.19	5.15	8.33	6.95	2.45	3.53
11	Etilo palmitato	628-97-7				2.78	3.53	4.50	9.87		11.64
12	Caryophyllene	87-44-5							1.34	2.56	2.44
13	Palmitato metílico	112-39-0							0.90	0.30	0.40

Fuente: Informe de laboratorio de toxicología, Análisis de CG - EM

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente trabajo de graduación tuvo como objetivo general extraer y caracterizar la oleorresina de la hoja de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.) extraída por el método de lixiviación dinámica con tres concentraciones de etanol en la solución extractora etanol – agua.

La materia prima se obtuvo de las montañas de la Finca Chichabac, en el municipio de Tecpán, departamento de Chimaltenango. Se ubica a unos 2,286 metros sobre el nivel del mar con coordenadas 14° 45' 39" N, 90° 59' 54" O. Su clima es de templado a frío, llegando a tener temperaturas entre los 10 y 23 °C.

En la realización del proceso se procedió a secar las hojas haciendo un tratamiento previo para llevarlo a un 10 % de humedad y se mantuvo en un ambiente fresco y protegido de la luz previo a su extracción, con el fin de conservar la materia prima libre de exceso de humedad.

Para llevar a cabo una mejor extracción de oleorresina, por medio de un molino de cuchillas se trituró la materia prima, para reducirla y homogenizarla; y de esta manera aprovechar al máximo la etapa de lixiviación, en donde se pone en contacto con el disolvente y éste absorbe todos los constituyentes de la planta.

Posteriormente para la obtención de los datos se procedió a iniciar las extracciones por medio de lixiviación utilizando para ello la relación hoja seca/solvente de 1:10 (w/v), realizándose el procedimiento a temperatura ambiente y con un tiempo de extracción de 3 horas. Para lo anterior se

utilizaron 3 concentraciones de etanol (95%, 70% y 35% v/v) y un tamaño de partícula que pasó el tamiz No. 5 (4 mm) y fue retenido por un tamiz No. 200 (75 μm), con 3 repeticiones para cada concentración de solvente resultando 9 unidades experimentales en total.

Obtenida el extracto se procedió a concentrar la oleorresina llevándose a cabo a presión reducida, haciendo énfasis en la temperatura, se trabajó dentro de un rango de temperatura del 40 °C – 60 °C, con el fin de no deteriorar los constituyentes de la especia por efecto de una temperatura muy elevada.

El rendimiento de la extracción varió dependiendo de la concentración de la solución extractora utilizado como se muestra en la tabla VIII, esto se debe a que la mayoría de metabolitos no son miscibles con el agua, como es el caso del linalool, nerolidol, 1,8 – cineol que son los compuestos mayoritarios y tienen mayor presencia a una concentración de solvente del 95% ya que la baja polaridad del mismo ayuda a su extracción. A partir de lo anterior se determinó que es la mejor concentración para la extracción de la oleorresina ya que se tienen los rendimientos más altos con un 21% en promedio para esta concentración, 15% para etanol al 70% y 11% para etanol al 35%. Por otra parte una fuente de error en los resultados se debió a que la naturaleza viscosa de la oleorresina creó la tendencia a dejar parte del material en los recipientes que los contienen y subsecuentemente esto es perdido tratándose así de eliminar en la mayor cantidad posible éstas pérdidas. Al realizar análisis de varianza y aplicando la comparación de medias por medio de la prueba de Tukey – Kramer al rendimiento se determinó que el método de lixiviación se ve afectado significativamente por la concentración de etanol en la solución extractora.

Otro de los puntos evaluados en la investigación fue la determinación de la densidad teniendo como resultado que la densidad aumentó en comparación con las densidades de los solventes puros (Etanol al 95% 0.810 g/mL, Etanol al 70% 0.866 g/mL, Etanol al 35% 0.943 g/mL). Para los valores de densidad obtenidos, hay un efecto significativo del solvente utilizado ya que se puede observar que la densidad de los extractos de oleorresina tienen un comportamiento inverso en comparación con la concentración de solvente utilizada; teniendo también en cuenta que ningún extracto según el solvente sobrepasa la densidad de otro solvente con densidad mayor.

Posteriormente, se realizó el análisis de varianza y una prueba de medias de Tukey – Kramer estableciéndose que la densidad se ve afectada significativamente por la concentración del solvente debido a que el valor calculado es mayor que el tabulado y por ello se acepta la hipótesis alternativa tomando en cuenta para ello un nivel de significancia de un 5%.

Para los valores que se obtuvieron del índice de refracción de la oleorresina se puede observar que los índices más altos se encontraron en los extractos en donde se utilizó etanol al 95% (v/v) y éstos se ven afectados según la concentración del solvente utilizado y confirmándose en el análisis de varianza y basándose en la prueba de medias de Tukey – Kramer.

Aparte de lo anterior se realizó un análisis de cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG – EM) y se pudieron identificar 13 componentes en la oleorresina de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.). El mayor número de componentes que se identificaron en las muestras se obtuvo con etanol al 95% debido a que la mayoría de componentes de la oleorresina son hidrofóbicos y por ello en algunas ocasiones su presencia fue muy baja o nula como se observa en la tabla X.

CONCLUSIONES

1. El mayor y menor rendimiento de la oleorresina de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.) se obtuvo de la extracción con etanol al 95 y 35 % (v/v) respectivamente, lo que se interpreta que el rendimiento extractivo es directamente proporcional al porcentaje de etanol en la solución extractora.
2. El compuesto mayoritario en la oleorresina de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.) es el Linalool.
3. La baja polaridad permitió extraer trece metabolitos secundarios reflejado en las extracciones con etanol al 95%
4. El orden decreciente del área de detección de metabolitos secundarios en cromatografía gaseosa acoplada a la espectrometría de masas fue linalool, 1, 8 – cineol, (Z) – nerolidol y trans – dihidrocarvona.
5. Los compuestos que estuvieron presentes en todas las extracciones independientemente de la concentración del solvente fue α – Thujone (Tuyona) y β – Thujone (Tuyona).
6. Existe diferencia significativa en el rendimiento de la oleorresina de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.) en función de la concentración de la solución extractora.

7. Para los valores de densidad de los extractos etanólicos obtenidos de la hoja de laurel (*Litsea guatemalensis Mez.*) en función de la concentración de la solución extractora se tiene que si hay diferencia significativa.

8. Existe diferencia significativa entre los valores obtenidos para índices de refracción de los extractos etanólicos obtenidos de la hoja de laurel (*Litsea guatemalensis Mez.*) en función de la concentración de la solución extractora.

RECOMENDACIONES

1. Es necesario hacer una corrida inicial, para establecer los puntos críticos del proceso de extracción de la oleorresina
2. Utilizar etanol con la menor cantidad de agua posible, ya que es difícil eliminarla de la oleorresina; además la mayoría de compuestos de esta no son miscibles en agua.
3. La recolección de la materia prima debe realizarse del mismo lugar geográfico y toda la materia prima debe ser almacenada correctamente y ser secada inmediatamente para evitar variaciones en las pruebas fisicoquímicas.
4. Evaluar posibles aplicaciones de la oleorresina de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.) en productos alimenticios por sus propiedades saborizantes, y en productos farmacéuticos por las propiedades curativas de sus compuestos mayoritarios.
5. Se debe tomar en cuenta que para la concentración, a las muestras se les debe quitar totalmente el solvente que estuviese presente, para obtener una oleorresina libre de impurezas. Para ello se debe utilizar un rotavapor con medidor de presión digital, con bomba de vacío incorporada capaz de alcanzar presiones reducidas hasta de 40 microbar, para lograr obtener oleorresinas de alta calidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cáceres, Armando. Plantas de uso medicinal en Guatemala. (Colección Monografías, Volumen 1). Guatemala: Editorial Universitaria. 1996. Pp. 226, 227.
2. Geankopolis, Christie J. Procesos de transporte y operaciones unitarias. 3era ed. México: Editorial Continental, 2004. Pp. 800 – 822.
3. Sharapin, Nikolai. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. Editorial CYTED, Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Colombia, 2000. Pp.151, 181.
4. Treybal, Robert. Operaciones de Transferencia de Masa. 2da ed. México: Editorial Mc – Graw Hill, 1993. Pp. 625 – 719.
5. Walpole, Ronald. Probabilidad y estadística para ingenieros. 6ta ed. México: Editorial Pearson Educación, 1999. Pp. 463 – 468.

BIBLIOGRAFÍA

1. Badui Dergal, Salvador. **Química de los alimentos** 3era. ed. México: Editorial Addison Wesley Longman, 1993. Pp. 56 – 60.
2. Bidlingmeyer, B. A. **Practical HPLC methodology and applications**. New York: John Wiley and Sons, Inc. 1992. Pp. 25 – 35.
3. De León Hernández, Edgar Gamaliel. Evaluación del rendimiento de aceite esencial de Laurel (*Litsea guatemalensis*) en función de la altitud sobre el nivel del mar a la cual creció la planta y el tamaño de partícula a destilar por el método de destilación por arrastre con vapor de agua. (Trabajo de graduación ingeniero químico. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ingeniería, 2001.) Pp. 27 – 30.
4. López Mazín, Julio Gabriel. Evaluación del rendimiento de oleorresina de las hojas de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.) de Tecpán, Chimaltenango en función del tamaño de partícula, utilizando dos solventes distintos a nivel planta piloto. (Trabajo de graduación ingeniero químico. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ingeniería, 2004.) Pp. 3 – 18.
5. Ortíz Quiroa, Cinthya Patricia. Obtención y comparación fisicoquímica a nivel laboratorio del aceite esencial de laurel de dos diferentes especies (*Litsea guatemalensis* Mez. y *Litsea glaucescens* HBK.) colectadas en tres diferentes lugares. (Trabajo de graduación ingeniera química. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ingeniería, 2005.) Pp. 15 – 30.

6. Standley, Paul C. & Steyermark, Julian. **Flora of Guatemala**. Fieldiana: Botany. 24 (4): 314-317.
7. UNCTAD / GATT. **Aceites Esenciales y Oleorresinas: Estudio de Distintos Productores y de Mercados Importantes**. Ginebra: Centro de Comercio Internacional, 1986. Pp. 53.
8. Vides, Tito. Obtención y Caracterización de Oleorresina de Clave (*Eugenia caryophyllata, Thunb*), Cultivado en Guatemala, a Nivel Planta Piloto. (Trabajo de graduación ingeniero químico. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ingeniería, 2005.) Pp. 7 – 16.

APÉNDICE A

Figura 10. Requisitos académicos para la elaboración de tesis en ingeniería química relativa a la extracción de oleorresina de laurel (*Litsea guatemalensis Mez.*).

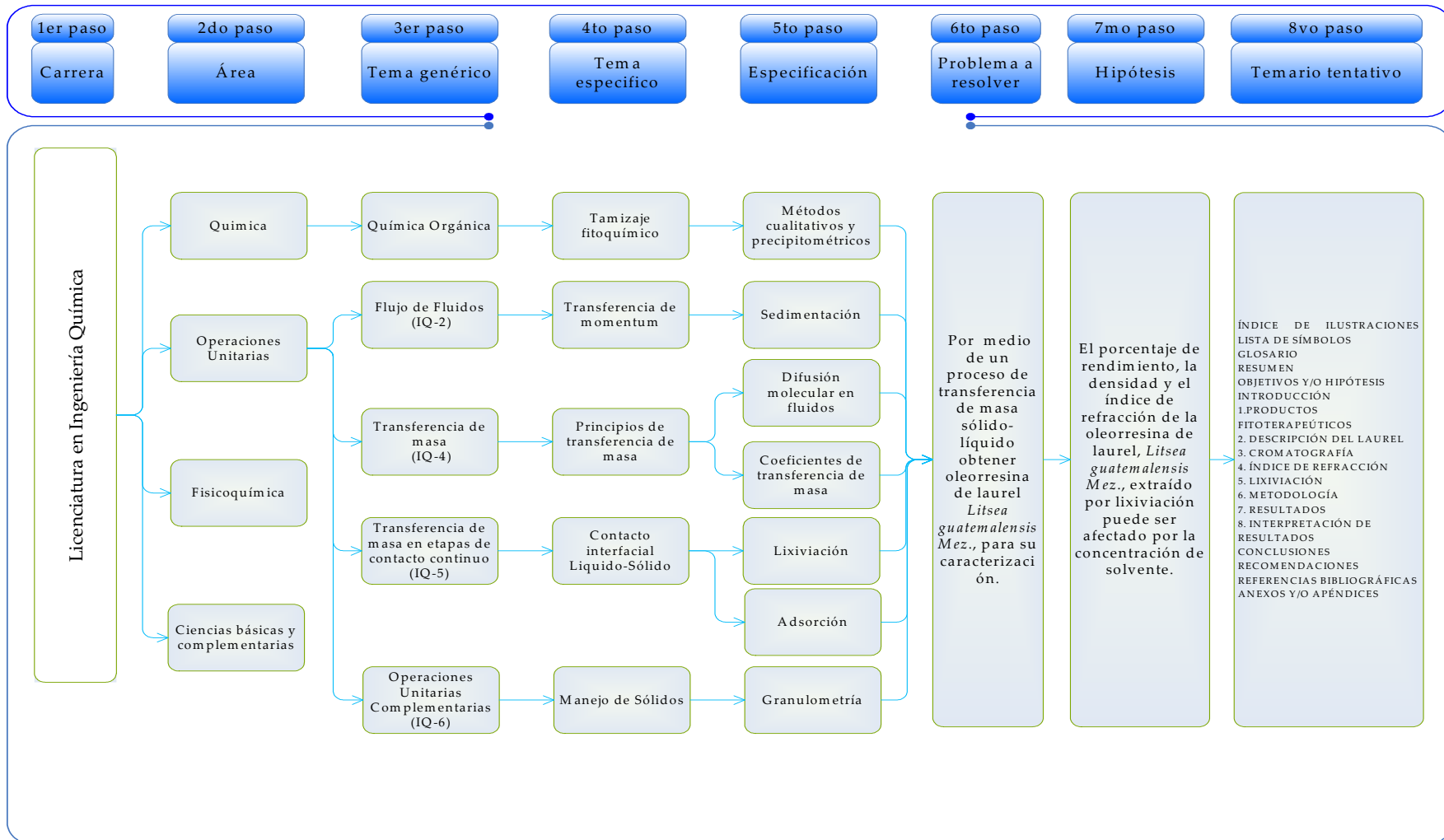


Figura 11. Diagrama de evaluación del proceso de lixiviación para la extracción de oleorresina de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.).

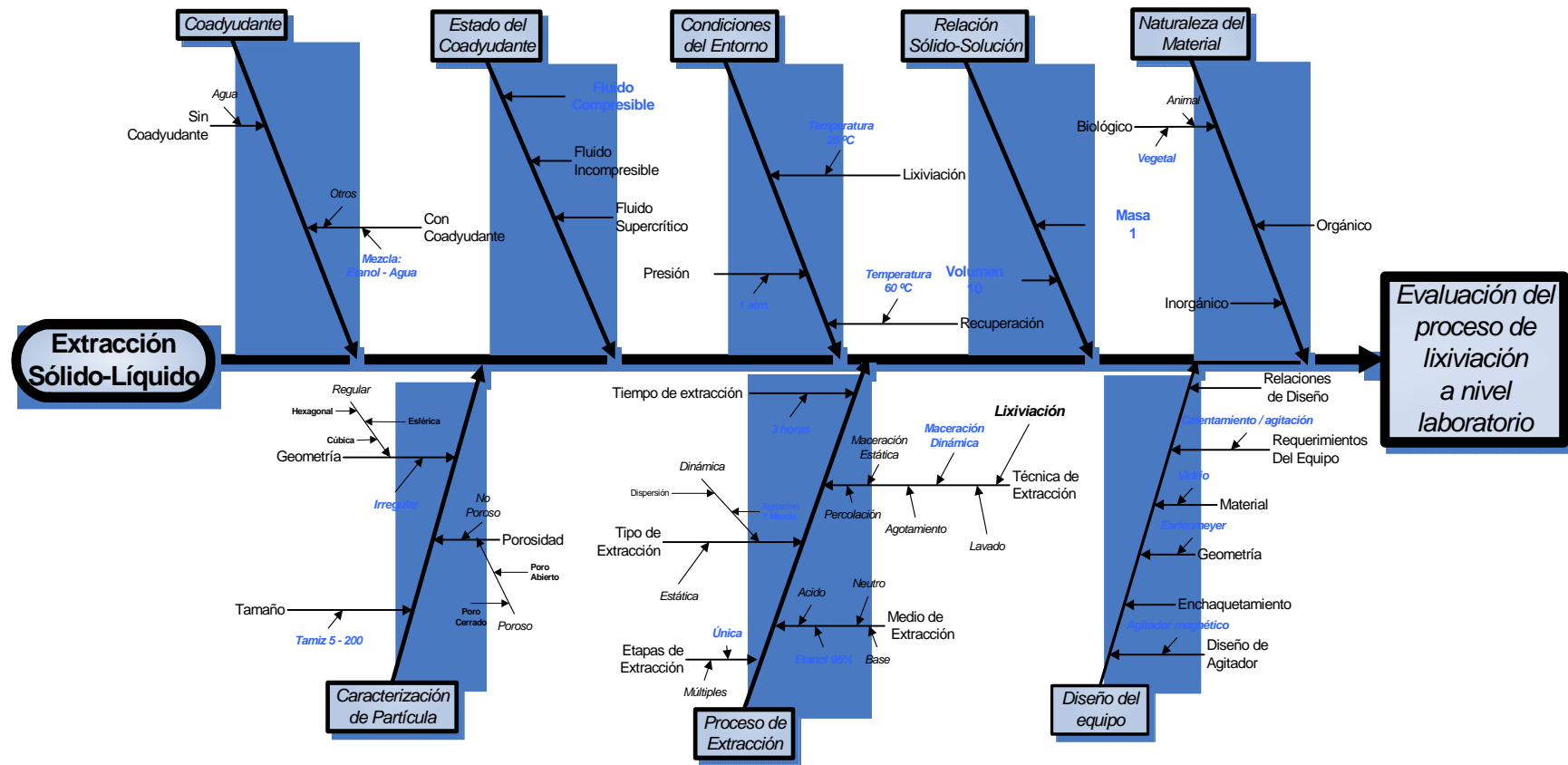
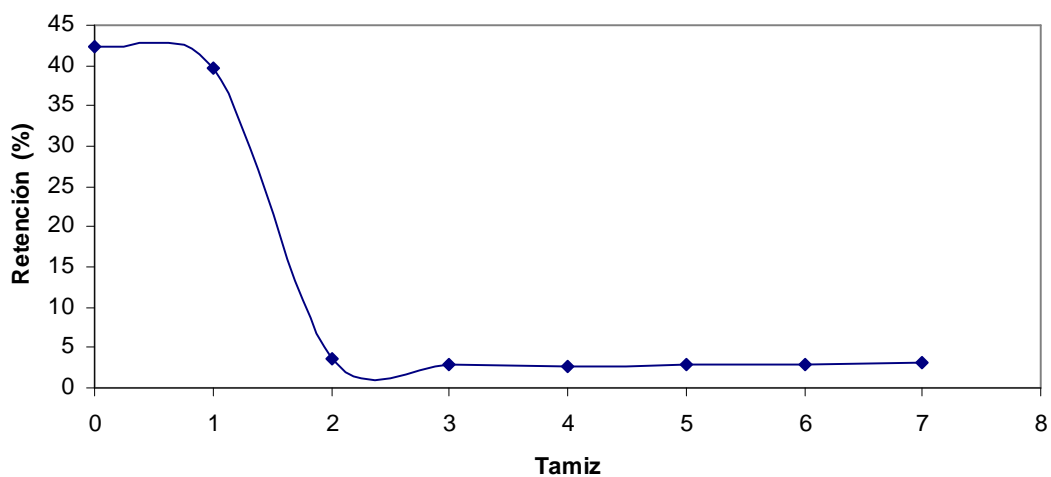


Tabla XI. Granulometría de la molienda de la hoja de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.)

	Tamiz	Peso (g)	Retención (%)	Acumulada
0	5	167.66	42.27	167.66
1	10	157.4	39.68	325.06
2	30	14.81	3.73	339.87
3	40	11.36	2.86	351.23
4	50	10.33	2.60	361.56
5	60	11.07	2.79	372.63
6	100	11.07	2.79	383.7
7	200	12.95	3.26	396.65

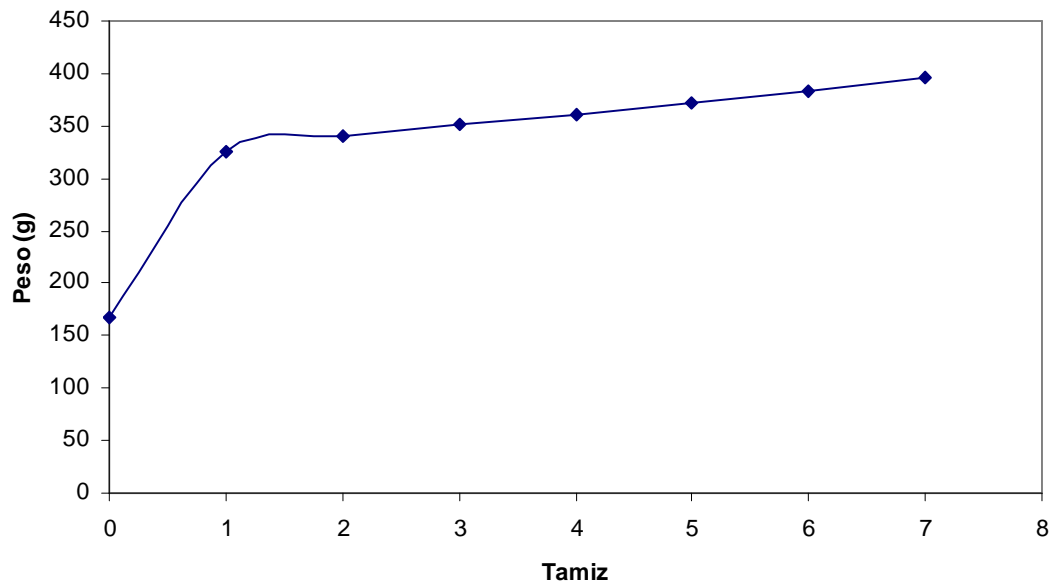
Fuente: Datos calculados.

Figura 12. Diagrama de granulometría de la molienda de la hoja de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.)



Fuente: Tabla XI

Figura 13. Diagrama de granulometría acumulada de la molienda de la hoja de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.)



Fuente: Tabla XI

APÉNDICE B

Análisis Estadístico (Programa PHSTAT)

Los análisis estadísticos elaborados se basaron en el Análisis de Varianza (ANDEVA) y la prueba de Tuckey; para ello se utilizó el programa PHSTAT.

Tabla XII. Estadística descriptiva del rendimiento porcentual de oleorresina de laurel (*Litsea guatemalensis Mez.*)

	Etanol al 35%	Etanol al 70%	Etanol al 95%
Media	10.84826667	15.38486667	21.03473333
Error típico	0.126987313	0.223541684	0.761363622
Mediana	10.7896	15.4706	21.5304
Desviación estándar	0.219948479	0.387185554	1.318720476
Varianza de la muestra	0.048377333	0.149912653	1.739023693
Coficiente de asimetría	1.114887777	-0.947567014	-1.452453267
Rango	0.428	0.76	2.4938
Mínimo	10.6636	14.962	19.54
Máximo	11.0916	15.722	22.0338
Suma	32.5448	46.1546	63.1042
Repetición	3	3	3
Nivel de confianza (95.0%)	0.546382311	0.961822236	3.275883265

Fuente: Análisis estadístico (Programa PHSTAT)

Tabla XIII. Estadística descriptiva de la densidad de los extractos etanólicos de la hoja de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.)

	Etanol al 35%	Etanol al 70%	Etanol al 95%
Media	0.959	0.877	0.838
Error típico	0.001732051	0.00305505	0.002081666
Mediana	0.959	0.879	0.839
Desviación estándar	0.003	0.005291503	0.003605551
Varianza de la muestra	9E-06	2.8E-05	0.000013
Coficiente de asimetría	0	-1.457862967	-1.152069638
Rango	0.006	0.01	0.007
Mínimo	0.956	0.871	0.834
Máximo	0.962	0.881	0.841
Suma	2.877	2.631	2.514
Repetición	3	3	3
Nivel de confianza (95.0%)	0.007452413	0.013144821	0.008956686

Fuente: Análisis estadístico (Programa PHSTAT)

Tabla XIV. Estadística descriptiva del índice de refracción de los extractos etanólicos de la hoja de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.)

	Etanol al 35%	Etanol al 70%	Etanol al 95%
Media	1.48	1.503	1.52
Error típico	0.0020817	0.0030551	0.0005774
Mediana	1.481	1.501	1.52
Desviación estándar	0.003606	0.005292	0.001000
Varianza de la muestra	1.3E-05	2.8E-05	1.00E-06
Coficiente de asimetría	-1.152069638	1.457862967	9.99201E-13
Rango	0.007	0.01	0.002
Mínimo	1.476	1.499	1.519
Máximo	1.483	1.509	1.521
Repetición	4.44	4.509	4.56
Cuenta	3	3	3
Nivel de confianza (95.0%)	0.008956686	0.013144821	0.002484138

Fuente: Análisis estadístico (Programa PHSTAT)

Tabla XV. Medias y desviaciones estándar obtenidas en el rendimiento de la oleorresina de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.)

Solución extractora		Promedio	σ	σ Error de la media	Intervalo de confianza del 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	3	10.85	0.2199	0.1270	10.3019	11.3946	10.6636	11.0916
2	3	15.38	0.3872	0.2235	14.4230	16.3467	14.9620	15.7220
3	3	21.03	1.3187	0.7614	17.7589	24.3106	19.5400	22.0338

Fuente: Análisis estadístico (Programa PHSTAT)

Tabla XVI. Medias y desviaciones estándar de la densidad obtenidos en los extractos etanólicos de la hoja de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.)

Solución extractora		Promedio	σ	σ Error de la media	Intervalo de confianza del 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	3	0.96	0.0030	0.0017	0.9515	0.9665	0.9560	0.9620
2	3	0.88	0.0053	0.0031	0.8639	0.8901	0.8710	0.8810
3	3	0.84	0.0036	0.0021	0.8290	0.8470	0.8340	0.8410

Fuente: Análisis estadístico (Programa PHSTAT)

Tabla XVII. Medias y desviaciones estándar del índice de refracción obtenidos en los extractos etanólicos de la hoja de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.)

Solución extractora		Promedio	σ	σ Error de la media	Intervalo de confianza del 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	3	1.48	0.0036	0.0021	1.4710	1.4890	1.4760	1.4830
2	3	1.50	0.0053	0.0031	1.4899	1.5161	1.4990	1.5090
3	3	1.52	0.0010	0.0006	1.5175	1.5225	1.5190	1.5210

Fuente: Análisis estadístico (Programa PHSTAT)

Tabla XVIII. Prueba de Tukey – Kramer para el rendimiento de la oleorresina de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.)

Concentración (I)	Concentración (J)	Diferencia Absoluta	σ	Rango Crítico	Conclusión
1	2	4.53660	0.463958	2.013578	<i>Medias son diferentes</i>
2	3	5.64987	0.463958	2.013578	<i>Medias son diferentes</i>
1	3	10.18647	0.463958	2.013578	<i>Medias son diferentes</i>

Fuente: Análisis estadístico (Programa PHSTAT)

Tabla XIX. Prueba de Tukey – Kramer para la densidad de los extractos etanólicos de la hoja de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.)

Concentración (I)	Concentración (J)	Diferencia Absoluta	σ	Rango Crítico	Conclusión
1	2	0.082	0.002357	0.010229	<i>Medias son diferentes</i>
2	3	0.039	0.002357	0.010229	<i>Medias son diferentes</i>
1	3	0.121	0.002357	0.010229	<i>Medias son diferentes</i>

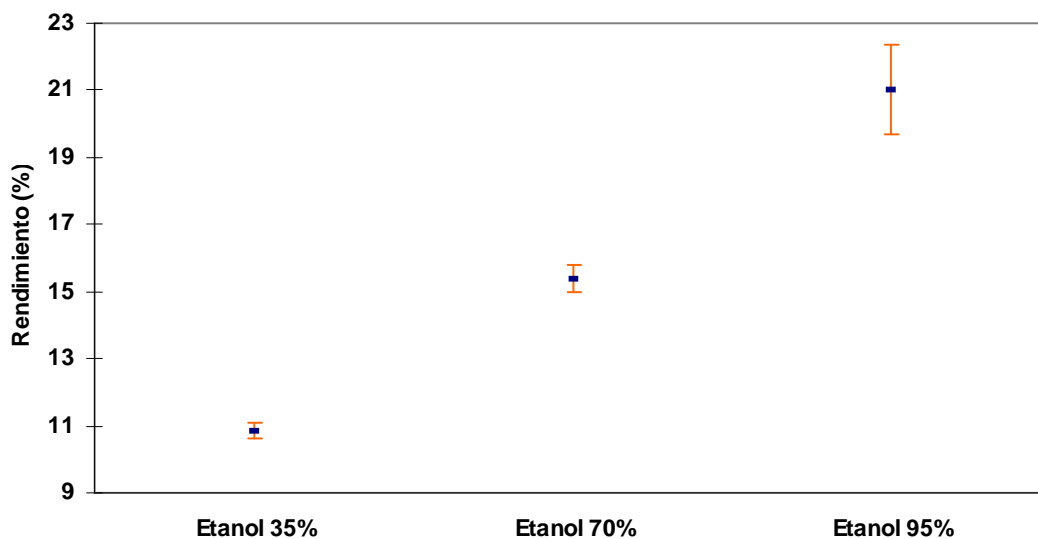
Fuente: Análisis estadístico (Programa PHSTAT)

Tabla XX. Prueba de Tukey – Kramer para el índice de refracción de los extractos etanólicos de la hoja de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.)

Concentración (I)	Concentración (J)	Diferencia Absoluta	σ	Rango Crítico	Conclusión
1	2	0.023	0.00216	0.009375	Medias son diferentes
2	3	0.017	0.00216	0.009375	Medias son diferentes
1	3	0.04	0.00216	0.009375	Medias son diferentes

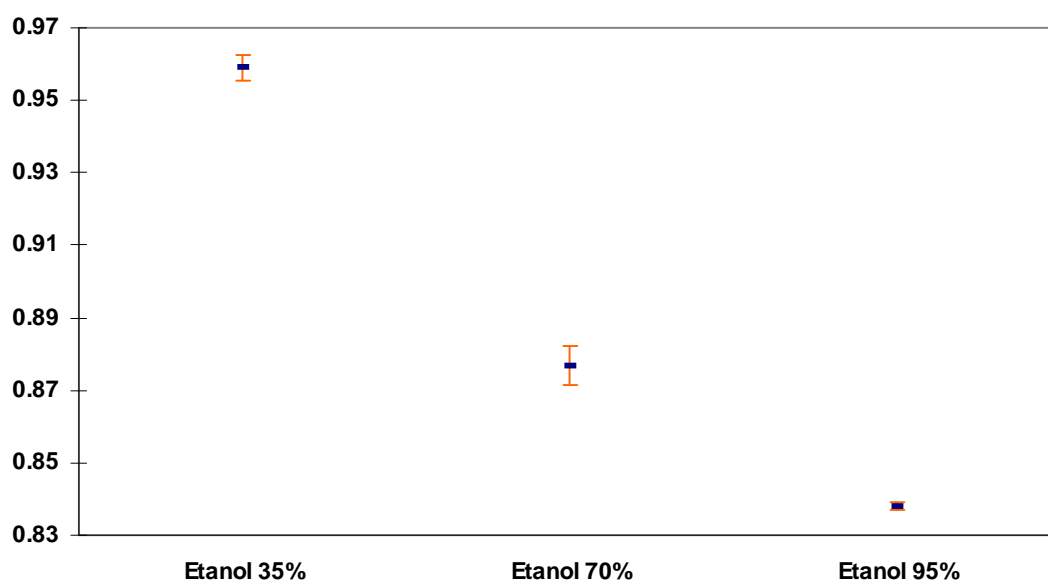
Fuente: Análisis estadístico (Programa PHSTAT)

Figura 14. Rendimiento porcentual promedio de la oleorresina de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.) en función de la solución extractora



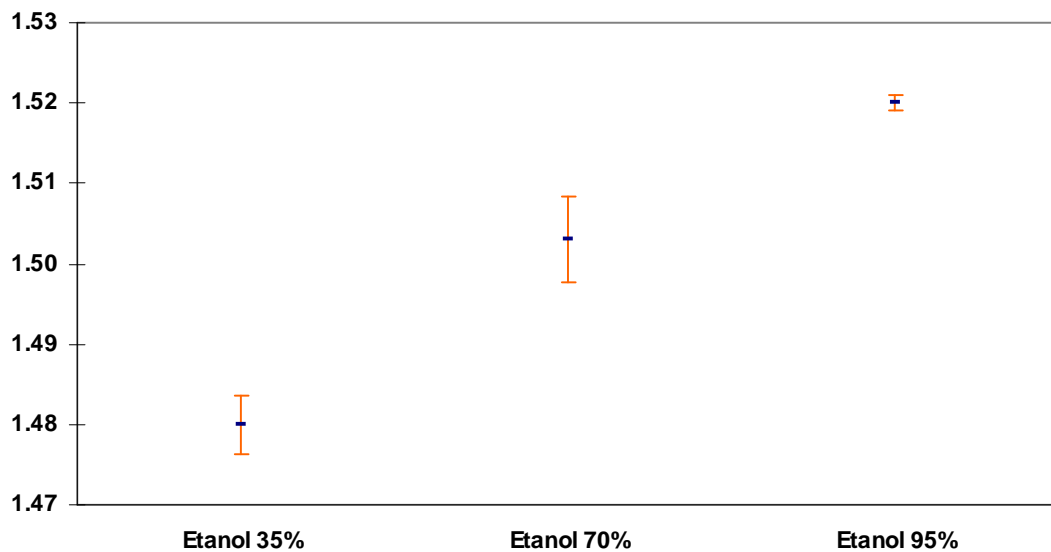
Fuente: Análisis estadístico (Programa PHSTAT)

Figura 15. Densidad a 20 °C de los extractos de la hoja de laurel promedio (*Litsea guatemalensis* Mez.) en función de la solución extractora



Fuente: Análisis estadístico (Programa PHSTAT)

Figura 16. Índice de refracción a 20 °C de los extractos de la hoja de laurel promedio (*Litsea guatemalensis* Mez.) en función de la solución extractora



Fuente: Análisis estadístico (Programa PHSTAT)

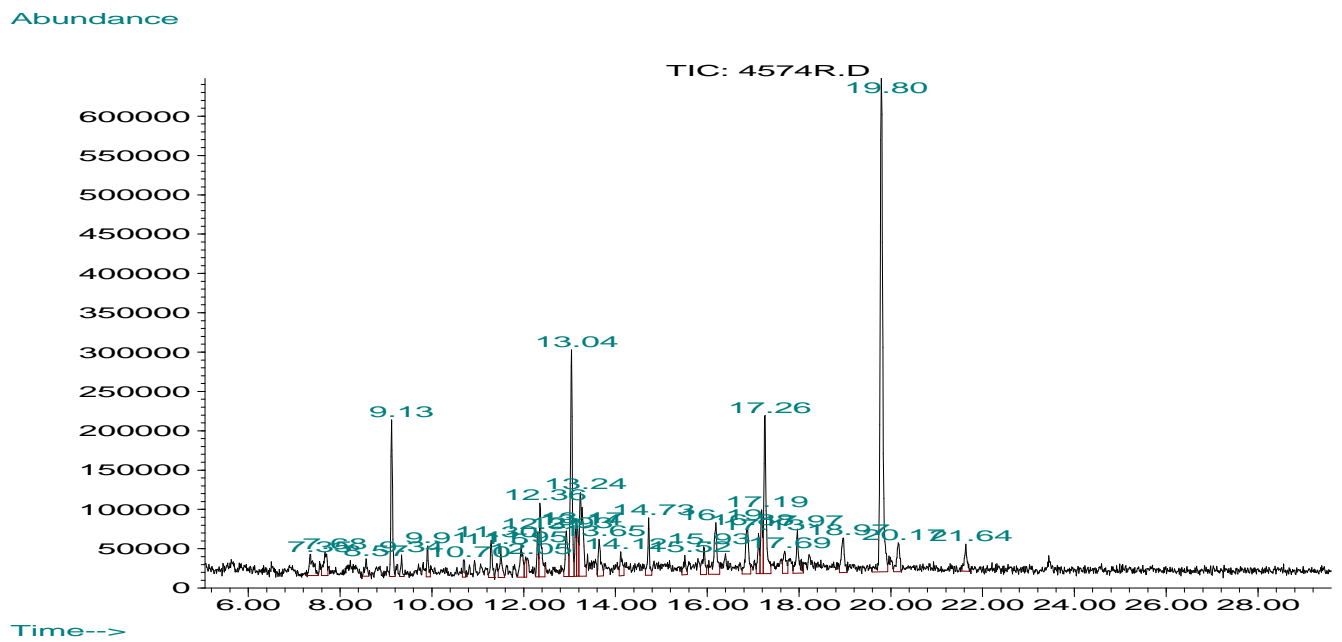
Tabla XXI. Prueba de homogeneidad de rendimiento, densidad e índice de refracción para los extractos de la hoja de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.)

	F Calculada	F Tabulada	Diferencia entre F	Logaritmo de la diferencia
Rendimiento	120.99	5.14	115.85	2.06
Densidad	686.58	5.14	681.44	2.83
Índice de refracción	86.36	5.14	81.21	1.91

Fuente: Análisis estadístico (Programa PHSTAT)

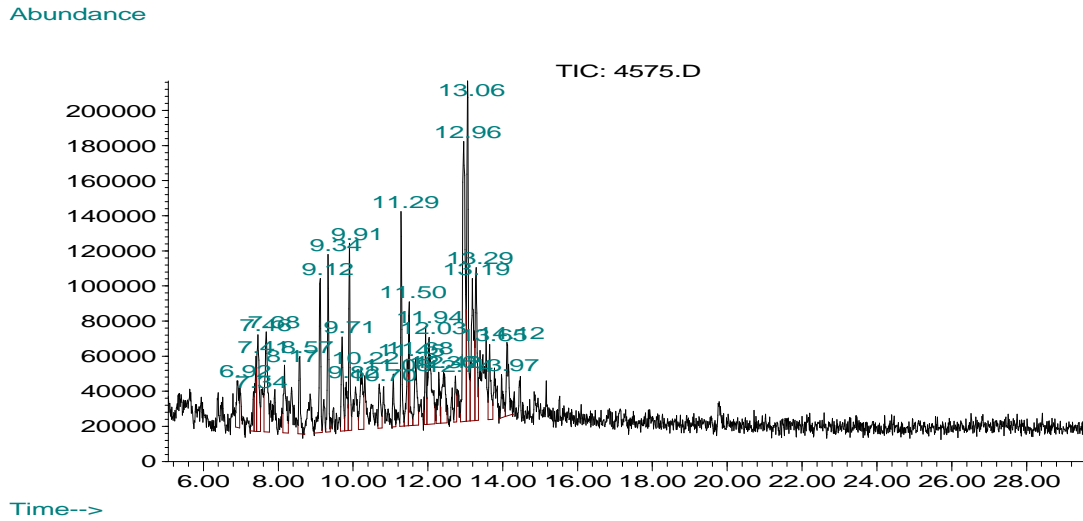
ANEXO

Figura 17. Cromatograma para la primera extracción de oleorresina de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.) utilizando etanol al 35%.



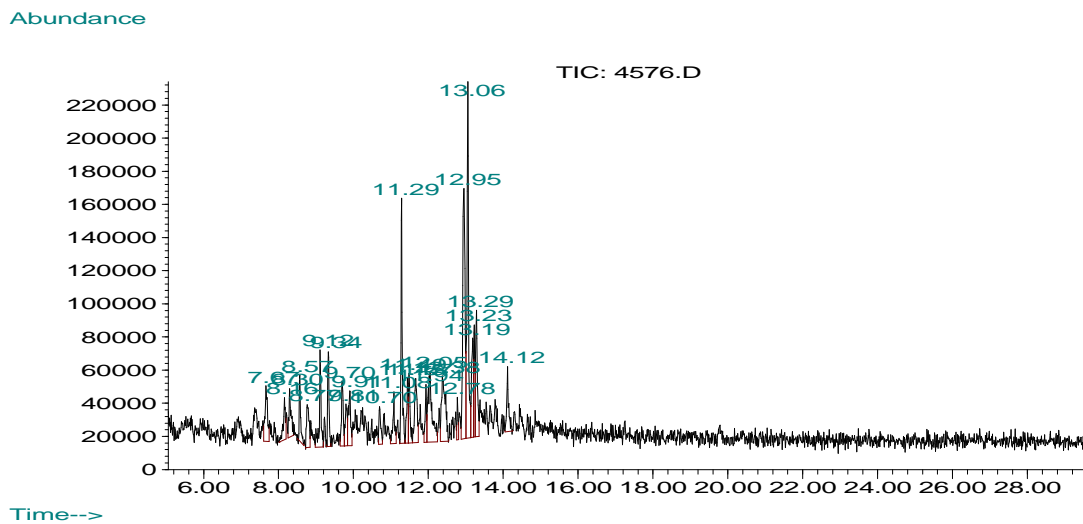
Fuente: Informe de laboratorio de toxicología, Análisis de CG - EM

Figura 18. Cromatograma para la segunda extracción de oleorresina de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.) utilizando etanol al 35%.



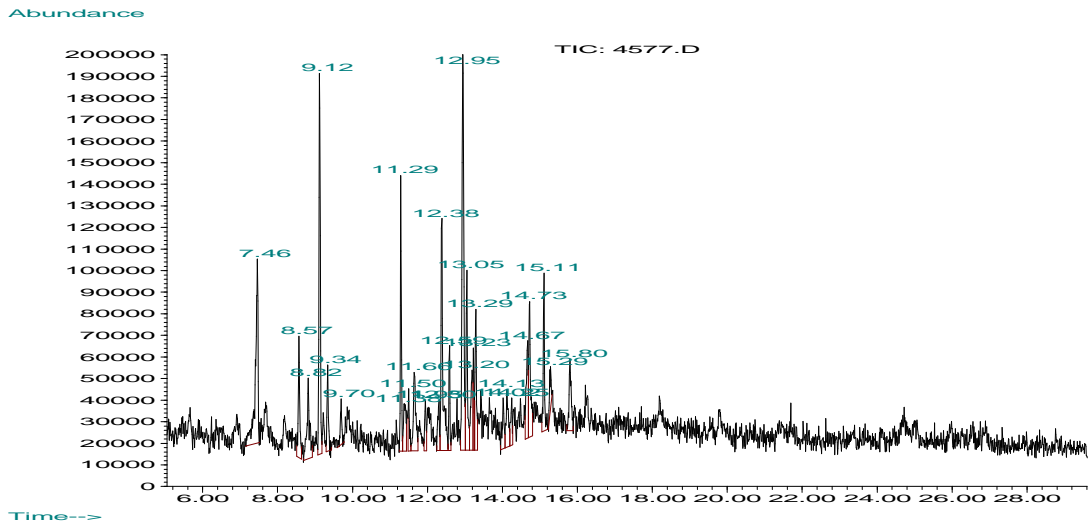
Fuente: Informe de laboratorio de toxicología, Análisis de CG - EM

Figura 19. Cromatograma para la tercera extracción de oleorresina de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.) utilizando etanol al 35%.



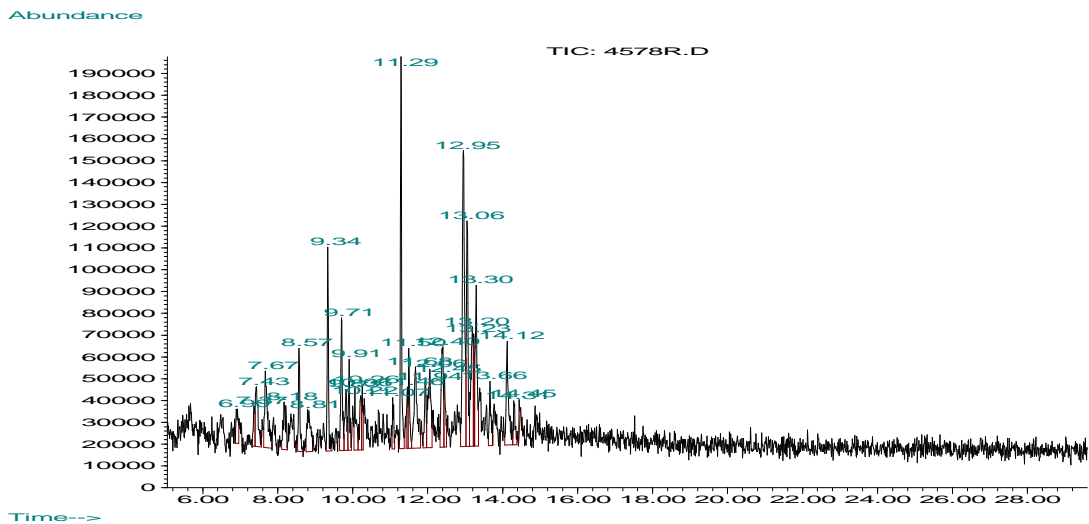
Fuente: Informe de laboratorio de toxicología, Análisis de CG - EM

Figura 20. Cromatograma para la primera extracción de oleorresina de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.) utilizando etanol al 70%.



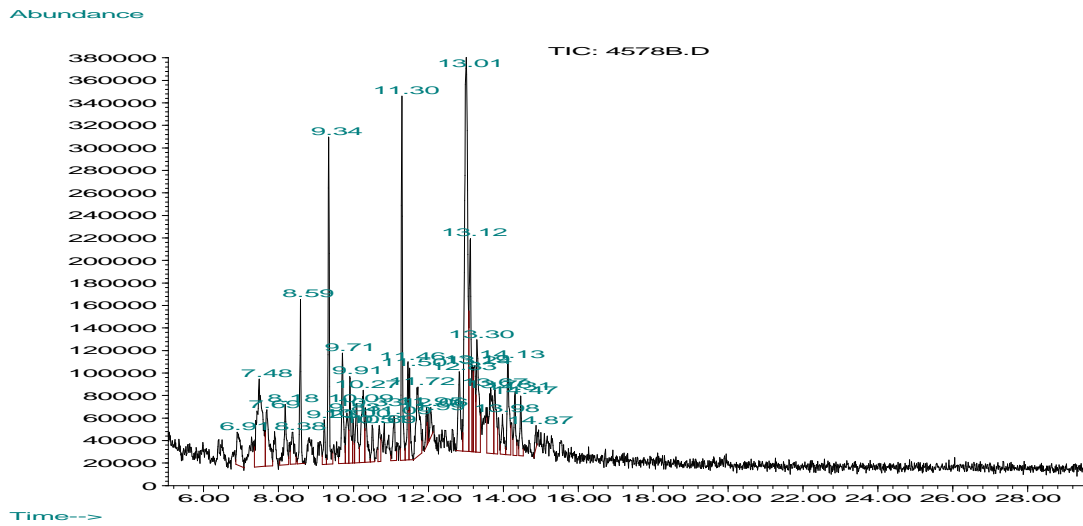
Fuente: Informe de laboratorio de toxicología, Análisis de CG - EM

Figura 21. Cromatograma para la segunda extracción de oleorresina de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.) utilizando etanol al 70%.



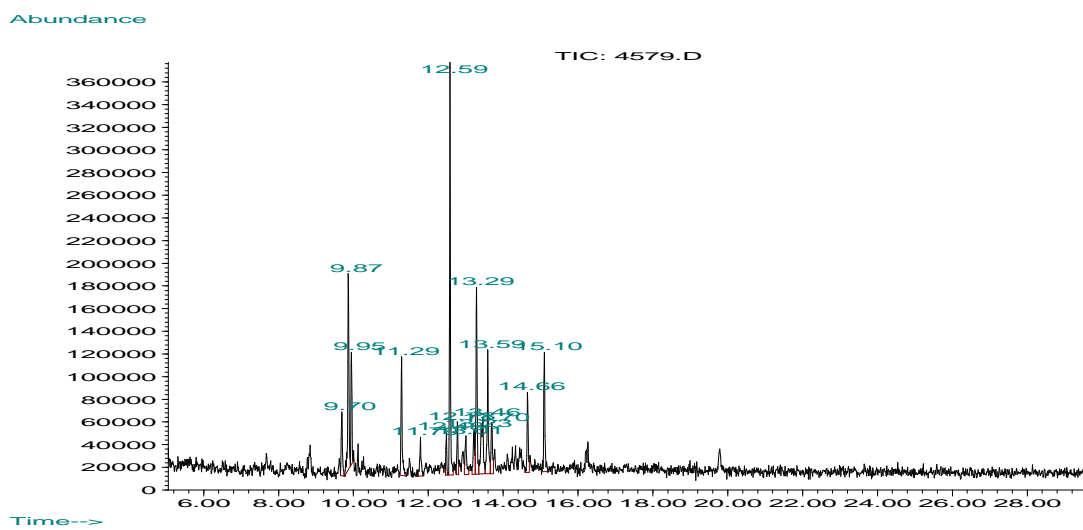
Fuente: Informe de laboratorio de toxicología, Análisis de CG - EM

Figura 22. Cromatograma para la tercera extracción de oleorresina de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.) utilizando etanol al 70%.



Fuente: Informe de laboratorio de toxicología, Análisis de CG - EM

Figura 23. Cromatograma para la primera extracción de oleorresina de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.) utilizando etanol al 95%.



Fuente: Informe de laboratorio de toxicología, Análisis de CG - EM

Figura 24. Cromatograma para la segunda extracción de oleorresina de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.) utilizando etanol al 95%.

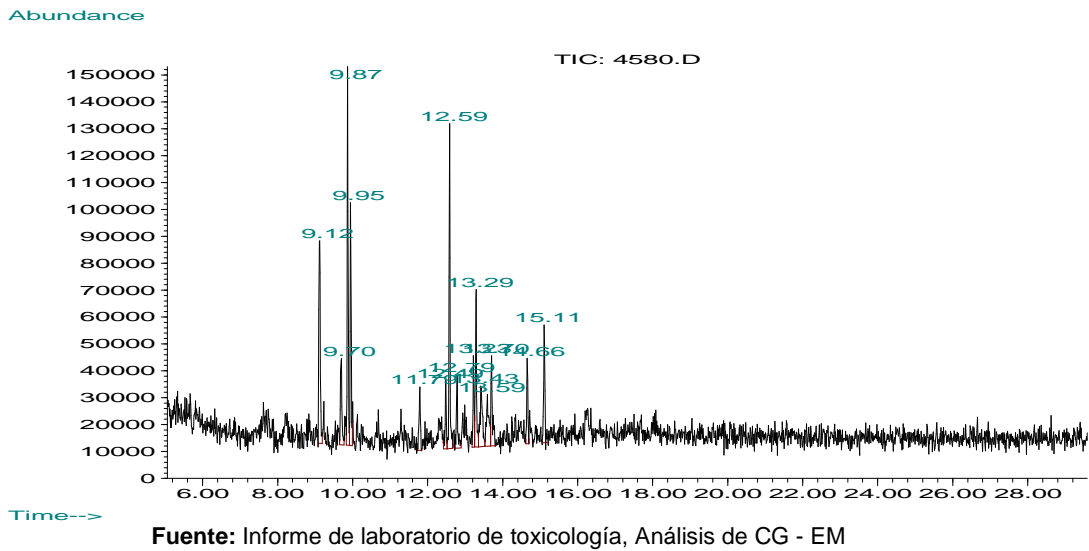


Figura 25. Cromatograma para la tercera extracción de oleorresina de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.) utilizando etanol al 95%.

