

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE QUÍMICA



TEMA:

CUANTIFICACION DE *TRANS*-ANETOL EN ACEITES ESENCIALES
EXTRAIDOS DE CINCO PLANTAS ANISADAS

PRESENTADO POR:

Br. LUZ MARINA RAMÍREZ RAMOS

PARA OPTAR AL GRADO DE:

LICENCIADA EN CIENCIAS QUÍMICAS.

DOCENTES DIRECTORES:

Dr. ALEX ADONAI OSORIO LANDAVERDE.

MSc. GUILLERMO DÍAZ Crespín.

CIUDAD UNIVERSITARIA, AGOSTO DE 2017.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE QUÍMICA



TEMA:

CUANTIFICACION DE *TRANS*-ANETOL EN ACEITES ESENCIALES
EXTRAIDOS DE CINCO PLANTAS ANISADAS

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR:

Br. LUZ MARINA RAMÍREZ RAMOS

PARA OPTAR AL GRADO DE:

LICENCIADA EN CIENCIAS QUÍMICAS.

DOCENTES DIRECTORES:

Dr. ALEX ADONAI OSORIO LANDAVERDE _____

MSc. GUILLERMO DÍAZ Crespín. _____

CIUDAD UNIVERSITARIA, AGOSTO DE 2017.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE QUÍMICA



TEMA:

CUANTIFICACION DE *TRANS*-ANETOL EN ACEITES ESENCIALES
EXTRAIDOS DE CINCO PLANTAS ANISADAS

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR:

Br. LUZ MARINA RAMÌREZ RAMOS

PARA OPTAR AL GRADO DE:

LICENCIADA EN CIENCIAS QUÍMICAS.

TRIBUNAL EVALUADOR:

Dr. NÉSTOR ORELLANA VELADO

Licdo. CARLOS ACOSTA GARCÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA, AGOSTO DE 2017.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR.

AUTORIDADES

MSc. ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO.
RECTOR.

Lic. CRISTOBAL HERNAN RIOS BENITEZ
SECRETARIO GENERAL

Lic. RAFAEL HUMBERTO PEÑA MARIN
FISCAL GENERAL

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA.

Lic. MAURICIO HERNÁN LOVO CÓRDOVA.
DECANO

Licda. DAMARIS MELANY HERRERA TURCIOS.
SECRETARIA

Dr. ALEX ADONAI OSORIO LANDAVERDE
DIRECTOR DE LA ESCUELA DE QUÍMICA

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de El Salvador

Dra. Ana Estévez Braun, Profesora del Departamento Química Orgánica de la Universidad de La Laguna, Tenerife, España.

Dr. Alex A. Osorio; por su apoyo incondicional, disponibilidad de tiempo, destacado y eficiente asesoramiento en la dirección de la presente investigación.

MSc. Guillermo D. Crespín; por el conocimiento transmitido hacia mi persona, asesoramiento desinteresado y orientarme de la mejor manera.

Dr. Néstor G. Orellana, Docente de Química Analítica, Escuela de Química, de la Universidad de El Salvador; por sus ideas, tiempo y dedicación en diversas etapas de este proyecto.

Licdo. Carlos E. Acosta; Docente de Química Orgánica, Escuela de Química, de la Universidad de El Salvador; por su invaluable apoyo y tiempo en realizar observaciones oportunas.

Licdo. Dagoberto Rodríguez, Curador del Herbario del Jardín Botánico La Laguna, El Salvador; por colaborar con la orientación, búsqueda e identificación de dos especies vegetales.

Dr. Rafael G. Escoto, Secretario de Investigaciones Científicas de la Universidad de El Salvador

Dr. José Luis Argueta Antillón Rector histórico de mi amada Alma Mater.

A mi amiga Wendy Criollo por confiar y creer en mí demostrándome su apoyo incondicional con vivencias y locuras hemos formado un equipo de amistad-académico.

A mis compañeros y amigos del Consejo Superior Universitario Gestión 2013-2015; Alison, Lennin, el chichi, Licdo. Carranza, Luis Tobar, Lupi, Licdo. Milton y sobre todo a Gabriela Álvarez “Pastelón” de cada uno de ustedes aprendí muchísimo en especial en la Comisión Disciplinaria y Conflictos.

A mis amigos y colegas de la Escuela de Química y de la Asociación de Estudiantes de Ciencias Químicas; Borisito, Richard, Alex, Nata, Marvel, Irving, Marvin, Jennifer Chávez, Jennifer Gabriel, Maura, Maldonado, Joaquín, Gerson, Diana “mamasota” Abi “Colosha” y Katia “Katosha incluida a mi pequeña Avril” fue un honor ser su Vice-Presidenta ASECCQ 2015.

A mis amigos y compañeros de la Asamblea General Universitaria Gestión 2015-2017; Fatimita, Kearley, Paty, Jhonny mi Paisano, Licdo. Magaña, La peque, Manciita, Farfán, Ing. Mancía, Isidro, Licdo. Danilo “Mi Dany”, Licdo. Ludwin, Licda. Mirian, Licda. Emely, Josefina, Licda. Hilda, Amapola “Madre”, Carito, Ali, Niña Dinorita, Niña Roxy, Licda. Zamora; fue un privilegio formar parte de las Comisiones de Legislación, Asociaciones Estudiantiles, Cultura y Realidad Nacional.

A mis Docentes que con mucho esmero y entusiasmo me ayudaron para ser quien soy, hoy en día; Niña Paty (Kínder), Don Adrián, Niña Sandra, Niña Daysi, Niña Aida, Niña Martita, Don Saúl, Don Fredy, Don Lisandro (Educación Básica); Licda, Liseth, Niña Ana Ruth, Niña Silvia, Don Marlon, Niña Balquiria, Licdo. Penado, Don Mario “Patito el mejor entrenador del futbol Salvadoreño” el mejor entrenador (Educación Media); Licda. Barrieri, Licda. Bersabe, Ing. Benedicto, Ing. Erazo (Educación Superior).

DEDICATORIAS

A Dios y a la virgencita de la paz por regalarme salud, por guiarme por el camino del bien, colocando ideas y pensamientos positivos en mi vida siempre y por permitirme llegar hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

A mi madre: Porque gracias a usted soy quien soy, por su ejemplo de fortaleza, perseverancia, humildad y humanidad, porque siempre me motiva en cada proyecto de mi vida y aun cuando éramos dos (mi hermana gemela y yo) logró sacarnos adelante con sacrificio y con mucha honra; gracias mamá (Marie).

A mi hermana: Porque aun siendo almas gemelas somos polos opuestos hemos aprendido la una de la otra pero sobre todo en los momentos más difíciles siempre estamos unidas para defendernos entre nosotras y sobre todo por regalarme a mi hijo gracias hermana (Pompo).

A mi hermano: ¡Ay Dios jugador! ¿Cuántos autogoles hizo? Porque eres el menor de mis hermanos, siempre me regañas por todo y por nada pero sé muy bien que soy la única con la que tú puedes hablar de cualquier tema (cultura general) futbolista profesional gracias por tus locuras hermano (jugador estrella).

A mi sobrino: Mi amor bello gracias por tu linda existencia te amo Don Miguel eres mío, mío, mío, besos mi cielo a tu cortita edad he aprendido de ti sobre todo entrenando para cuando tenga a tus primitos mi amor gracias sobrino (Miquelón).

A mi amiga: Licda. Irma Lucia Vides por todo infinitamente por todo; gracias por su hermosa amistad, por su confianza, por estar pendiente de mí, por ayudarme en muchos aspectos de vida (académica, personal, espiritual y económica), mi confidente la que siempre apoya mis decisiones usted es un ángel que Dios me envió forma de amiga, gracias Licda. (ilvides).

“Dios no manda cosas imposibles, sino que, al mandar lo que manda, te invita a hacer lo que puedas y pedir lo que no puedas y te ayuda para que puedas” San Agustín

Contenido General

1.0 INTRODUCCIÓN	11
2.0 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo General	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
3.0 MARCO TEÓRICO	16
3.1 Aceites esenciales	16
3.2 Aprovechamiento de aceites esenciales	16
3.3 Composición química de aceites esenciales en general.....	16
3.4 Clasificación de aceites esenciales	17
3.5 Fuentes y estado natural de aceites esenciales	18
3.6 Generalidades del <i>trans</i> -anetol.....	19
3.7 Aplicaciones de <i>trans</i> -anetol.....	19
3.8 Descripción general de aceites esenciales anisados.....	20
3.8.1 Anís (<i>Pimpinella anisum</i>)	20
3.8.2 Anís estrella (<i>Illicium verum</i>).....	22
3.8.3 Hinojo silvestre (<i>Foeniculum vulgare</i>).....	23
3.8.4 Santa María (<i>Piper marginatum Jacq</i>)	26
3.8.5 Anisillo (<i>Tagetes filifolia Lag</i>)	28
3.9 Fundamentos de la extracción.....	29
3.9.1 Extracción líquido-líquido.....	31
3.9.2 Extracción de aceites esenciales.....	32
3.9.4 Destilación por corriente de vapor	34
3.9.5 Extracción con fluidos supercríticos	35
3.10 Generalidades de la cromatografía	37
3.10.1 Tipos de cromatografía.....	38
3.10.2 Cromatografía analítica en capa fina.....	39
3.10.3 Cromatografía en placa fina preparativa.	41
3.10.4 Cromatografía en columna.....	42
3.10.5 Cromatografía de gases	44
3.10.6 Introducción en técnicas acopladas.....	48
3.10.7 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)	48
3.11 Elucidación Estructural	50
3.11.1 Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	50
3.11.2 Resonancia Magnética Nuclear de ¹ H y ¹³ C	51
3.11.3 Principios de la espectrometría de masas.....	53

4.0 DISEÑO METODOLÓGICO	56
4.1 Tipo de Estudio	56
4.2 Investigación bibliográfica	56
4.3 Investigación de campo	56
4.3.1 <i>Piper marginatum Jacq</i>	57
4.3.2 <i>Tagetes filifolia Lag</i>	58
4.3.3 <i>Pimpinella anisum, Illicium verum y Foeniculum vulgare</i>	58
4.4 Investigación de laboratorio	59
4.4.1 Destilación por corriente de vapor	59
4.4.2 Extracción con disolventes	60
4.4.3 Eliminación de disolvente a presión reducida	61
4.4.4 Secado	61
4.4.5 Identificación de <i>trans</i>-anetol y anisaldehído por cromatografía en capa fina analítica	61
4.4.6 Aislamiento de <i>trans</i>-anetol y anisaldehído por cromatografía en capa fina preparativa	62
4.4.7 Identificación de <i>trans</i>-anetol y anisaldehído	63
4.4.8 Cuantificación de <i>trans</i>-anetol por Cromatografía de Gases (GC)	63
4.4.9 Esquemas de trabajo para la obtención y análisis de aceites esenciales	65
5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	71
5.1 Elucidación estructural	71
5.1.1 Espectroscopia de Infrarrojo	71
5.1.2 Resonancia Magnética Nuclear de ¹H, ¹³C y 2D HSQC	72
5.2 CUANTIFICACIÓN	75
5.2.1 Curva de calibración	76
6.0 CONCLUSIONES	86
7.0 RECOMENDACIONES	89
8.0 REFERENCIAS	91



CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

1.0 INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales se extraen de diversas plantas aromáticas generalmente localizadas tanto en países mediterráneos como tropicales y son parte importante de la medicina tradicional. Estas sustancias son líquidas, volátiles y rara vez coloreadas, solubles en lípidos y solubles en disolventes orgánicos con una densidad generalmente más baja que la del agua. En las plantas se almacenan en las flores, hojas, tallos, ramas, semillas, frutas, raíces, madera o corteza (1).

Los aceites esenciales, son muy conocidos por sus propiedades antiséptica, bactericida, antiviral y fungicida también por sus propiedades tales como preservantes de alimentos envasados, analgésicos antiinflamatorios y anestésicos locales.

Las especias, perfumes, resinas y gomas, pertenecen a grupo de sustancias que proceden del metabolismo de las plantas, elaborados como productos secundarios. Se trata de una amplia variedad de compuestos orgánicos, dentro de los que juegan un papel importante, los derivados terpénicos. Los terpenos se encuentran en cantidad apreciable en cerca de dos mil especies de plantas repartidas en unas 60 familias, entre ellas: labiadas, pináceas, rutáceas y umbelíferas.

Existen varios métodos de extracción, los empleados en esta investigación fueron; destilación por arrastre de vapor, mediante un proceso de codestilación con agua permitió separar sustancias insolubles en agua y ligeramente volátiles en este caso el aceite esencial. También se empleó extracción con solventes orgánicos, técnica que consistió en sumergir las especies vegetales en solventes de baja polaridad y de bajo punto de ebullición. Empleando ambas técnicas se consiguió aislar *trans*-anetol y anisaldehído, dos metabolitos secundarios mayoritarios. El *trans*-anetol es parte de la composición de las esencias de al menos 20 especies vegetales y se encuentra en grandes cantidades en la esencia del anís, *Pimpinella anisum* (92-96%), en el aceite de casia, en los aceites de la corteza de la canela, del clavo y en el aceite de tomillo.(2)

En esta memoria se reporta el estudio fitoquímico de cinco especies vegetales productoras de *trans*-anetol:

- a) Anís (*Pimpinella anisum*)
- b) Anís estrella (*Illicium verum*)
- e) Hinojo silvestre (*Foeniculum vulgare*)
- c) Santa María (*Piper marginatum Jacq*)
- d) Anisillo (*Tagetes filifolia Lag*)

A la fecha en El Salvador, no existen estudios fitoquímicos de Santa María (*Piper marginatum Jacq*), Anisillo (*Tagetes filifolia Lag*) e Hinojo silvestre (*Foeniculum vulgare*), que las describan como plantas productoras de *trans*-anetol.

Los metabolitos secundarios tienen como precursores a los metabolitos primarios, pero su distribución en el reino vegetal es más limitada y para determinados compuestos queda restringida a ciertas especies, por lo tanto es improbable que desarrollen un papel fundamental en el metabolismo primario. En cuanto a su función, podríamos decir que los metabolitos secundarios son una medida de la adecuación de un organismo para la supervivencia en un ecosistema determinado.⁽³⁾

Los metabolitos secundarios mayoritarios (*trans*-anetol y anisaldehído) se purificaron empleando diversas técnicas cromatográficas; una vez purificados se realizó la elucidación estructural de ambos metabolitos mediante Espectroscopia Infrarroja IR, Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ¹H y ¹³C ; finalmente se hizo la cuantificación de *trans*-anetol por Cromatografía de Gases, siendo el extracto vegetal de *Pimpinella anisum* el que más contenido de *trans*-anetol posee (79.48%).



CAPITULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Determinar *trans*-anetol en aceites esenciales extraídos de cinco plantas anisadas.

2.2 Objetivos específicos

1. Extraer los aceites esenciales de cinco plantas anisadas.
2. Identificar los metabolitos secundarios mayoritarios, contenidos en la mezcla de los aceites esenciales, por Cromatografía en Capa Fina Analítica (CCF).
3. Aislar los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en los aceites esenciales, por Cromatografía en Capa Fina Preparativa (CCFP).
4. Identificar el metabolito *trans*-anetol en los aceites esenciales, por espectroscopia de IR, RMN ^1H y ^{13}C .
5. Cuantificar el metabolito *trans*-anetol en los aceites esenciales por Cromatografía de Gases (CG).
6. Establecer la relación de variabilidad del contenido de *trans*-anetol, entre las cinco plantas anisadas.



CAPITULO III

MARCO TEÓRICO

3.0 MARCO TEÓRICO

3.1 Aceites esenciales

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua y son las sustancias responsables del aroma de las plantas. En cuanto a sus aplicaciones, son importantes en la industria cosmética, alimenticia y farmacéutica. (4)

Los aceites esenciales se pueden encontrar en las hojas, flores, semillas, corteza, raíces o frutos de diversas plantas algunos de ellos se evaporan al contacto con el aire, por lo que también son conocidos como **aceites volátiles**. Generalmente, se obtienen a través de procesos de extracción con disolventes, extracción con fluidos supercríticos o destilación por arrastre con vapor. (5)

Durante la edad media, las esencias formaron parte de los productos de gran valor comercial que se transportaban desde Asia a Europa; ya entre los siglos XVI y XVII más de 100 aceites esenciales fueron empleados en perfumería y en medicina tradicional en Europa. (6)

3.2 Aprovechamiento de aceites esenciales

Ellos son ampliamente utilizados como ingredientes en las industrias de saborizantes, perfumería y farmacéutica; su agradable fragancia y la naturaleza terapéutica han acrecentado sus aplicaciones en el campo de la **aromaterapia**, es decir, su uso en aceites de masaje para aliviar diferentes dolencias y ansiedades o simplemente como accesorios de belleza. En consecuencia, se han realizado investigaciones sobre diversas fuentes de aceites esenciales que incluyen, el cultivo de plantas, la mejora de los métodos de extracción y los análisis de aceites esenciales para la identificación de sus componentes.

(7)

3.3 Composición química de aceites esenciales en general

Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas de varios componentes, que pueden formar parte de grupos químicos tales como:

- Hemiterpenos (Compuestos alifáticos de bajo peso molecular como alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos).
- Monoterpenos.
- Sesquiterpenos.
- Fenilpropanos.

3.4 Clasificación de aceites esenciales

Los aceites esenciales se clasifican con base en diferentes criterios: **Consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios.**

a). Por su consistencia, los aceites esenciales se clasifican en **esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas.**

Las Esencias fluidas son líquidos volátiles a temperatura ambiente. Los bálsamos son de consistencia más espesa, poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización. Se caracterizan por tener un alto contenido de ácido benzoico y ácido cinámico, así como sus correspondientes ésteres. Como ejemplos se puede mencionar; bálsamo de copaiba, bálsamo del Perú, benjuí, bálsamo de tolú y estoraque.

Las oleorresinas, son mezclas homogéneas de resinas y aceites esenciales. Así por ejemplo, la trementina que se obtiene del pino, está compuesta por resina ó colofonia y aceite esencial de trementina, los cuales se separan por destilación por arrastre de vapor.⁽⁸⁾

b) Por su origen, los aceites esenciales se clasifican como: **Naturales, artificiales y sintéticos.**

Los aceites esenciales naturales, se obtienen directamente de la planta y debido a su rendimiento tan bajo, son muy costosos. Los aceites esenciales artificiales, se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes. Por otra parte, los aceites esenciales sintéticos, como su nombre lo indica son producidos por la combinación de componentes producidos por procesos de síntesis química; son de bajo coste y por ende, más utilizados como aromatizantes y saborizantes (esencias de vainilla, limón, fresa, y otros).⁽⁵⁾

c) Por la naturaleza química de los componentes mayoritarios, los aceites esenciales que son ricos en monoterpenos se denominan **aceites esenciales monoterpenoides** (aceite de hierbabuena, albahaca y salvia.), los ricos en sesquiterpenos son los **aceites esenciales**

sesquiterpenoides (aceite de copaiba, pino y junípero) y los ricos en fenilpropanos son los **aceites esenciales fenilpropanoides** (aceite de clavo de olor, canela y anís).

Aunque esta clasificación es muy general, nos resultará útil para propósitos de estudiar algunos aspectos fitoquímicos de los monoterpenos, los sesquiterpenos y los fenilpropanos⁽⁷⁾

3.5 Fuentes y estado natural de aceites esenciales

Los aceites esenciales se encuentran ampliamente distribuidos en unas 60 familias de plantas que incluyen las *Compuestas*, *Labiadas*, *Lauráceas*, *Mirtáceas*, *Pináceas*, *Rosáceas*, *Rutáceas* y *Umbelíferas*.

Se pueden encontrar en diferentes partes de las plantas como:

- **Las hojas:** Ajenjo, albahaca, buchú, cidrón, eucalipto, hierbabuena, limoncillo, menta, pachulí, romero, salvia y toronjil.
- **Las raíces:** Angélica, ásaro, azafrán, cálamo, cúrcuma, jengibre, sándalo, sasafrás, valeriana y vetiver.
- **El pericarpio:** De los frutos de limón, mandarina y naranja.
- **Las semillas:** Anís, cardamomo, eneldo, hinojo y comino.
- **El tallo:** Canela y caparrapi.
- **Las flores:** Árnica, lavanda, manzanilla, piretro, tomillo, clavo de olor y rosa.
- **Los frutos:** Alcaravea, cilantro, laurel, nuez moscada, perejil y pimienta⁽⁹⁾

Aunque en los aceites esenciales tanto los monoterpenos, los sesquiterpenos y los fenilpropanos se encuentran en forma libre, más recientemente se han investigado los que están ligados a carbohidratos, ya que se considera que son los precursores inmediatos del aceite como tal.⁽⁹⁾

La densidad de los aceites esenciales suele ser inferior a la del agua, salvo los de canela, clavo de olor y sasafrás, con una densidad superior a la unidad.

Los contenidos en aceite esencial no suelen superar el 1% en la mayoría de los casos. Aunque una excepción, la constituye el clavo de olor (botón floral de *Eugenia caryophyllus*) cuyo contenido puede superar al 15%.

La mayoría de los aceites se usan en cosméticos, masajes, aromaterapia, artesanías o en productos de limpieza; otros son usados como repelentes de insectos tanto para el hombre

como para el ganado, y en medicina se aplican en el tratamiento de una amplia diversidad de afecciones.⁽⁷⁾

3.6 GENERALIDADES DEL *TRANS*-ANETOL

El *trans*-anetol, es un éter aromático insaturado, que pertenece al grupo de los **fenilpropanoides** (figura 1). Normalmente, los aceites esenciales anisados contienen cantidades variables de ***trans*-anetol** y su isómero, el ***cis*-anetol**, así como de otros compuestos relacionados, como **alil-anisol** y **anisaldehído**.

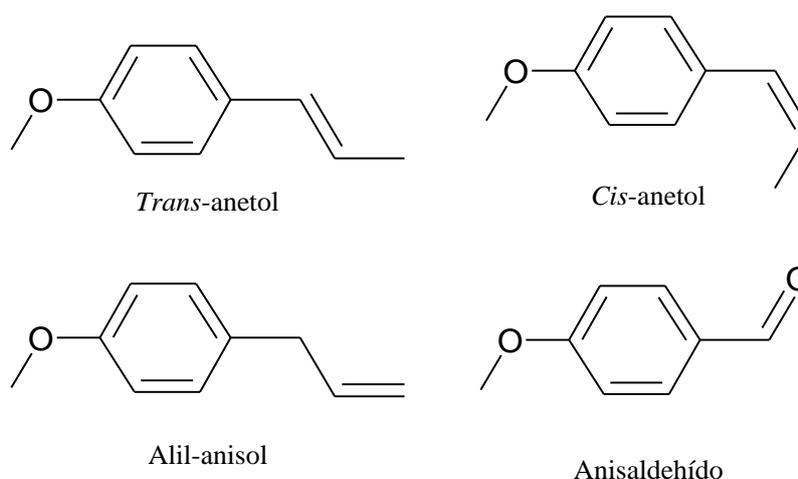


Figura 1. Fenilpropanoides que normalmente se encuentran en aceites esenciales anisados.

Constituye el componente principal en los aceites esenciales de varias plantas como el anís, anís estrellado e hinojo, en los cuales, el contenido varía entre el 10-50% ⁽¹⁰⁾. Además de *trans*-anetol, los aceites esenciales de plantas aromáticas anisadas, contienen cantidades variables.

Se ha determinado que, el *trans*-anetol es 13 veces más dulce que el azúcar, por esta razón, la percepción de su sabor es agradable en la lengua y sólo en grandes cantidades ⁽¹¹⁾, (lo cual está por encima del contenido normal en alimentos y bebidas) es irritante y ligeramente tóxico (espasmolítico). Por ejemplo, el licor anisado Ouzo, tiene cerca del 0.03% p/v de *trans*-anetol. ⁽¹²⁾

3.7 APLICACIONES DE *TRANS*-ANETOL

En general el *trans*-anetol tiene muchos usos; en primer lugar es un aditivo común para proporcionar sabor en alimentos y bebidas. En algunas bebidas, tiene la propiedad de

formar micro emulsiones espontaneas, la cual proporciona la consistencia y apariencia blanquecina, tal es el caso del “Licor del Mono” y el licor griego “Ouzo”.(12).

El aceite esencial de anís (figura 2), es muy apreciado en el arte culinario del sur y el este de Asia. En la India masticar semillas de anís es un comportamiento normal después de una comida, al considerarse que actúa como un ambientador de la boca y del aparato digestivo.(10)

El aceite esencial de anís, se emplea en tratamientos de aromaterapia, gripe y resfriados. En otros tiempos, el aceite esencial incluso fue utilizado para tratar la sarna y los piojos.



Figura 2. Aceites esenciales extraídos de cinco plantas anisadas

En cuanto a sus propiedades medicinales, el anetol es efectivo como **nematicida, antimicrobiano e insecticida** (11), además, forma parte de los compuestos naturales quimiopreventivos, incluyendo cúrcumina, eugenol y limoneno, los cuales poseen la habilidad de suprimir la formación de cáncer, mediante la interferencia en diversos mecanismos de acción celular.(13).

3.8 Descripción general de aceites esenciales anisados

3.8.1 Anís (*Pimpinella anisum*)

El género *Pimpinella* está conformado por cerca de 150 especies, y pertenece a la familia **Apiaceae**. *Pimpinella anisum* figura entre las plantas medicinales más antiguas que se conocen, siendo mencionada por Teofrasto, Dioscórides y Plinio en sus escritos. Este último indicaba que se podían prevenir sueños desagradables si se colocaba bajo la almohada semillas de anís y se inhalaban su aroma durante la noche. Pitágoras, creía que el anís podía prevenir los vómitos y desordenes estomacales, y con efectos beneficiosos

para picaduras de escorpión. Otras citas antiguas, le atribuyen propiedades afrodisíacas y efectos sobre la insuficiencia respiratoria. (14)

El anís, denominado “Anís verde” en España, “Anacio” en Italia o “sweet cummin” en países de habla inglesa, ya era cultivado por los egipcios alrededor del año 1500 a.C. (figura 3). Su centro de origen es Grecia, Asia menor y Egipto. Actualmente se cultiva en regiones templadas y cálidas de España, Italia, Bulgaria, Rusia, Norte de África, India, Chile, México y Argentina. (15)



Figura 3. Cultivo y semillas de *Pimpinella anisum*

Aceite esencial de anís

El aceite esencial (2-3%) se localiza en numerosos canales secretores del fruto, de los cuales se obtiene por destilación de vapor de agua; es miscible con solventes orgánicos tales como; tolueno, ciclohexano, cloroformo, éter y etanol (se requiere 3 partes de etanol para disolver un volumen de aceite esencial de anís). (14) (figura 4).



Figura 4 Aceite esencial de *Pimpinella anisum*

Cuando se extrae, debe secarse y conservarse en un recipiente tan lleno como se pueda, bien cerrado y que permita su resguardo de la luz. Cuando el aceite esencial se expone

por largos periodos a la acción de la luz y del aire, va perdiendo lentamente la capacidad de cristalizar y se alteran sus físicas debido a la formación de sub-productos.⁽¹⁴⁾

Usos y propiedades

Las semillas de anís, se usan en la elaboración caramelos, pan, repostería y licores. Se utilizan como condimento y sazón para carnes, pescado y salsas. En relación al aceite esencial, forma parte de pastas dentífricas, repelentes de insectos debido a sus propiedades antisépticas; también se emplea en la elaboración de perfumes. ⁽¹⁵⁾

3.8.2 Anís estrella (*Illicium verum*)

El anís estrella, es originario de los bosques tropicales del sudeste asiático, donde se conoce como “badián de la China” o “badiana”. Es un árbol pequeño de 3-5 m de altura, es perennifolio, con corteza blanca y hojas lanceoladas enteras. Flores amarillo- rosados, pueden tener hasta 30 pétalos. Las flores producen un fruto en forma de estrella.

Los frutos son de color oscuro (figura 5), miden cerca de 2 cm de diámetro y parecen estrella formadas de ocho carpelos careniformes de 1 a 1.5 cm de longitud que al madurar se abren. Cada carpelo contiene una semilla suave, café. El pericarpio es color marrón y está arrugado por debajo florece en primavera, cuando comienzan las primeras lluvias; la vida media de un árbol es de 80 a 100 años y es muy cultivado en China, Filipinas y Jamaica. ⁽¹⁶⁾



Figura 5. Semillas de *Illicium verum*

Aceite esencial de anís estrella

El anís estrella contiene aproximadamente de 8-9% de aceite esencial, que es un líquido color amarilla pálido (figura 6). Entre sus componentes se encuentran: *trans*-anetol (80-90%) y limoneno (5%) además de pequeñas cantidades de anisaldehído, linalol, estragol,

fenchona, pineno, felandreno y ácido shikímico. También contiene taninos catéquicos, lignanos, lactonas sesquiterpénicas y sales minerales. (17)



Figura 6. Aceite esencial de *Illicium verum*

Usos y propiedades

Su nombre deriva de la característica forma estrella que poseen sus frutos y hojas. Se usa como condimento para aromatizar salsas curry, en confitería, chicles, caramelos, tabaco, licorería, preparaciones farmacéuticas y para la conservación de encurtidos. También se usa en perfumería y jabones. El fruto se mastica para perfumar el aliento y ayuda a la digestión.(16)

Entre los efectos terapéuticos del anís estrella, se describe como un eupéptico, carminativo, antiespasmódico, expectorante de acción directa sobre glándulas secretoras de mucosa respiratoria, estrogénico, galactagogo, pediculicida en uso tópico, especialmente activo frente al *Pediculus vestimenta*. En un estudio realizado sobre el extracto alcohólico de *I.verum* se encontró que, éste posee la capacidad de inhibir el crecimiento de *E.coli*, *B. subtilis* y *S. cerevisiae*. Las mujeres embarazadas y en período de lactancia deben evitar el uso interno del aceite esencial de anís estrella. (16)

3.8.3 Hinojo silvestre (*Foeniculum vulgare*)

Es una planta herbácea, perenne, perteneciente a la familia de las *Umbelíferas (Apiácea)*, de hasta 2 metros de altura. Posee una raíz carnosa, fusiforme de hasta 2 cm de diámetro, poco ramificada de color amarillo-blancuzco (figura 7). El tallo posee una base gruesa, es ramificado, cilíndrico, las hojas son grandes de hasta 30 cm de ancho por 40 cm de largo muy divididas y las apicales poseen segmentos muy finos.(15).

Como se muestra en la figura 7; las flores son pequeñas, hermafroditas, pentámeras con pétalos amarillo enrollados hacia adentro y carecen de cáliz, involucro e involucelo, el fruto es un esquizocarpo (diaquenio) elíptico derecho.



Figura 7. Flores de *Foeniculum vulgare*

Es una planta aromática y medicinal cuyas hojas y semillas e incluso la raíz poseen valor medicinal, por lo cual es muy utilizada en la industria farmacéutica, alimenticia y cosmética, sus brotes también son consumidos en ensaladas. Todas las partes de la planta exhalan un aroma característico a anís.

El hinojo es una planta de clima templado originaria de la cuenca del Mediterráneo y Asia menor. En el norte de Europa fue introducida por los romanos y en Sudamérica (es muy abundante en Chile) por los colonizadores europeos. Se produce en España, Alemania, Europa meridional, Sudamérica, China y Japón.⁽¹⁸⁾



Figura 8. Semillas de *Foeniculum vulgare*

El grano de hinojo (figura 8), contiene de 2-6% de aceite esencial, de los cuales, de 12-18% es extracto etéreo, 20% de proteína y 5% de azúcares. El contenido de aceite esencial es variable según el origen de las semillas, por ejemplo: Francés 2.1%; alemán 4.7%, persa 1.7% y japonés 2.7%.⁽¹⁸⁾

Aceite esencial de Hinojo

El aceite esencial se obtiene por destilación con arrastre de vapor de los frutos secos previamente remojados, enteros o molidos, también suele en algunos casos destilarse parte de la planta junto con el grano.



Figura 9. Aceite esencial de *Foeniculum vulgare*

El aceite esencial es un líquido incoloro, amarillo pálido (figura 9), cuyo sabor puede variar de netamente dulce, dulce anisado, amargo a alcanfor, acre y picante. El aceite esencial puede contener entre un 50-60% de *trans*-anetol y un 20% de fenchona. Análisis de aceites esenciales de hinojo en llevados a cabo en Turquía, presentan la siguiente composición: *trans*-anetol (75.7-86.5%), limoneno (4.25-9.15%), estragol (3.25-5.21%); fenchona (1.05-2.8%); alfa pineno (0.47-1.14%).⁽¹⁵⁾

Composición	Contenido promedio (%)
a-pineno	0.05-0.45
camfeno	0.02-0.26
b-pineno	0.01-0.07
limoneno	1.00-3.60
d-terpineno	0.08-0.26
terpinoleno	0.10-0.47
fenchona	0.10-2.50
Linalol	3.50-4.70
estragol	0.16-0.40
<i>cis</i> -anetol	0.16-0.40
<i>trans</i> -anetol	86.0-92.0
<i>p.</i> anisaldehído	0.90-2.60

Tabla 1. composición del Aceite esencial de *Foeniculum vulgare*

La norma de la Farmacopea francesa precisa que los frutos de hinojo dulce debe poseer un mínimo de 2% v/m de aceite esencial y señala dos tipos de aceite esencial según el

contenido de estragol. La norma IRAM-SAIPA expresa que el aceite esencial de hinojo se debe presentar como un líquido incoloro a amarillento, límpido y móvil, de olor característico (ver tabla 1). El aceite, debe protegerse de la luz y la humedad, guardarse en contenedores de vidrio o de hojalata, no de plástico, (15)

Usos y propiedades

El hinojo, posee propiedades estimulantes, aromáticas, antiespasmódicas, diuréticas, expectorante, galactogoga, eupépticas y carminativas. El principal interés de los granos de hinojo dulce reside en el contenido de aceite esencial contenido dentro de los tegumentos. Se utiliza para tratar los gases acumulados en el aparato digestivo, también en las afecciones estomacales y biliares, así como expectorante.(14)

El té caliente del hinojo silvestre alivia el ataque de asma, incrementa la secreción láctea en las madres. Calma los vómitos periódicos y los cólicos. El té frío alivia el dolor y la inflamación de los ojos y se emplea para elevar la presión arterial. Machacado y aplicado sobre las heridas detiene la pérdida de sangre. (14)

En la industria farmacéutica y cosmetológica, se usa como materia prima para la obtención de anetol, aromatizar dentífricos, pastas dentales y aguas dentífricas, al igual que en medicamentos estomacales y expectorantes. Es un aditivo importante en la fabricación de jabones, aerosoles e insecticidas domésticos e industriales para ocultar olores desagradables, también en la elaboración de licores y como soporífico suave en tabaco. Se pueden hacer fricciones con el aceite para aliviar dolores reumáticos.

3.8.4 Santa María (*Piper marginatum* Jacq)

Las *Piperáceas* son una familia de arbustos y trepadoras leñosas muy distribuidos en las regiones tropicales, Comprende 10 géneros, siendo los principales *Piper* y *Peperomia*. (19)

El género *Piper*, tiene cerca de 700 especies (20). Las especies de la familia *Piperáceas*, se caracterizan por tener hojas alternas, raramente verticiladas, con o sin estípulas (ver figura 10). Las flores son hermafroditas y lampiñas, se sitúan en las axilas de las brácteas y se reúnen en inflorescencias en espiga dispuestas en el ápice de las ramas. (21)



Figura 10. Planta de *Piper marginatum Jacq*

La planta *Piper marginatum Jacq*, es originaria de México y crece a lo largo de Centroamérica, y el trópico sudamericano. Crece en hábitats de clima cálido, semicálido y semiseco, desde el nivel del mar hasta los 2000 msnm. Crece a orillas de caminos, en vegetación del bosque tropical caducifolio, perennifolio y bosque mixto de pino-encino de terreno semiseco. Es cultivada también, ya que crece fácilmente y puede ser sembrada en cualquier época del año. (22)

Aceite esencial de Santa María

En el aceite esencial (figura 11), los compuestos oxigenados representan el 98.28 % y el resto corresponde a hidrocarburos sesquiterpénicos. Dentro de esta cantidad considerable de compuestos oxigenados, los principales componentes son: Isosafrol (37.31%), notosmirnol o isosmorizol (22.72 %), metil eugenol (7.32 %), safrol (7.02 %), la *trans*-asarona (5.88 %) y la miristicina (4.33%). (19)



Figura 11. Aceite esencial de *Piper marginatum Jacq*

La composición química del aceite de esta especie muestra gran variabilidad en cuanto a los componentes principales; así tenemos que se informó 80,5% de *trans*-anetol como

componente mayoritario de este aceite y determina la composición química de los aceites esenciales extraídos de hojas y tallos de *Piper marginatum Jacq* (23)

Usos y propiedades

Se emplean las hojas como envolvente en caso de fracturas, también para picaduras de alacrán y mordedura de víboras. Se usa como antipirético, antidiarreico, dolor e inflamación de estómago, para tratar problemas de bronquitis y tos, asma, laringitis, reumatismo, riñones, vista, dolores musculares y cólicos. Además, se usa en padecimientos como inflamación, infección de la matriz, dolor de estómago, espasmo, falta de apetito y estreñimiento.(24).

En la cocina es utilizado como condimento en mole verde, como envoltura de tamales y en platillos de camarón y pollo. (25).

3.8.5 Anisillo (*Tagetes filifolia Lag*)

Tagetes es un género de plantas herbáceas anuales o perennes en la familia de las Compuestas (*Asteraceae*). Su hábitat, se extiende desde México y Centroamérica hasta Argentina.

El anisillo es una planta pequeña, muy común en las colinas de clima fresco, especialmente en climas cálido, semicálido y templado, entre los 300 y 2400 msnm.(26).



Figura 12. Planta de *Tagetes filifolia Lag*

La planta tiene hojas opuestas, a veces alternas, pinatisectas, menuditas, flores pequeñas, blancas, solitarias, de cáliz tubuloso, involucre de varios flósculos (ver figura 12). Se reconoce fácilmente, pues al restregarla todas sus partes exhalan un olor muy pronunciado de anís. Nacen en los llanos y gramales de hierba fina donde es fácil reconocerlas por sus

tallos recostados y sus hojuelas compuestas de lanillas finas y verdes en número de siete.
(27).

Aceite esencial de Anisillo

La composición química del aceite esencial de *Tagetes filifolia* Lag (figura 13), se advierten algunas diferencias: 1). El número de sus compuestos reconocidos varía de 33,⁽²⁸⁾ 2). Se ha encontrado tanto *cis*-anetol como *trans*-anetol ^{(1),} 3). La cantidad de alilanisol y de *trans*-anetol en la composición total del aceite esencial es 61.2% y 33.1%.⁽²⁹⁾.



Figura 13. Aceite esencial de *Tagetes filifolia* Lag

Usos y propiedades

En distintas regiones de México, se suele tomar té de esta planta cuando se sufre de distintas afecciones estomacales. Así, en Oaxaca recomiendan beber un poco del alcohol donde se maceraron las hojas; en Hidalgo y Chiapas, se usa la infusión de las hojas o tallo tiernos. En Morelos, se toma la infusión caliente de las partes aéreas, antes de cada alimento o es administrado tres veces al día, a los niños cuando tienen cólicos.⁽³⁰⁾.

El té se consume durante las comidas, también se utiliza para batir la harina con la cual se va a preparar el pan para proporcionarle sabor; macerado en aguardiente se consume como aperitivo. Como saborizante anisado de cañas de maíz para masticar, para la elaboración de mezcal y de licor, como esencia de anís para saborizar cualquier bebida
(31).

3.9 Fundamentos de la extracción

La extracción es un método empleado para separar unos compuestos químicos de otros con los que se encuentran mezclados y disueltos en un mismo disolvente. Se basa en la diferente solubilidad de cada sustancia en dos líquidos inmiscibles. Esto es: El disolvente en el que se encuentran disueltos inicialmente y el disolvente de extracción.

Ambos se separan con facilidad, usando un embudo de extracción. Las fases utilizadas normalmente son agua y un disolvente orgánico, y los diferentes componentes de una mezcla se distribuyen entre ambas fases de acuerdo con sus solubilidades relativas.

Por ejemplo, consideremos una mezcla constituida por un compuesto orgánico parcialmente soluble en agua y diferentes sales inorgánicas solubles en agua, con todos los componentes de la mezcla disueltos en la suficiente cantidad de agua para disponer de una disolución homogénea.

La cantidad total del compuesto orgánico presente en la disolución acuosa inicial se repartirá en la fase etérea de acuerdo con las solubilidades relativas de dicho compuesto en éter y en agua. Ahora bien, como el compuesto orgánico suele ser mucho más soluble en éter que en agua, la mayor parte del compuesto orgánico habrá quedado disuelto en la fase etérea y las sales inorgánicas, que no son solubles en éter, permanecerán en la fase acuosa. (32)



Figura 14. Aparato de separación.

Mediante una decantación en el embudo de separación se separan las dos fases, se recoge la fase orgánica y se aísla el compuesto orgánico mediante una eliminación del éter por destilación a presión reducida o en rotaevaporador (ver figura 14).

El disolvente que se utilice en la extracción, debe cumplir los siguientes requisitos:

- a) Disolver fácilmente el (los) compuesto (s) orgánico (s) a extraer.
- b) Tener un punto de ebullición lo más bajo posible para que se pueda eliminar fácilmente en el rotaevaporador.
- c) Ser totalmente inmiscibles con el agua.
- d) No reaccionar con los compuestos orgánicos que se van a extraer.
- e) No ser inflamable ni tóxico.
- f) Ser relativamente de bajo costo.

El éter etílico es disolvente más utilizado en la extracción, y a pesar de ser muy inflamable y ser parcialmente miscible con el agua, el éter es un disolvente muy bueno para la disolución de la mayoría de los compuestos orgánicos; además, es fácil de eliminar a presión reducida por ser muy volátil (P.E.= 34.6 °C).

3.9.1 Extracción líquido-líquido

El término extracción, se define como la transferencia de una sustancia de una fase a otra que se lleva a cabo entre dos líquidos inmiscibles. Aunque cualquier proceso que implique la transferencia de un compuesto químico, entre dos fases líquidas inmiscibles, es una extracción, también es necesario distinguir los términos de **extracción** y **lavado**.

La **extracción** se refiere al paso de compuesto orgánico de interés, desde una fase acuosa a un disolvente orgánico, mientras que el **lavado** se realiza con una disolución acuosa para retirar de la fase orgánica, un compuesto no deseado (ver figura 15).

En una disolución de un compuesto A, en un disolvente 1 se extrae con otro disolvente 2, inmiscible con el primero, en el cual el compuesto A es más soluble. El compuesto se repartirá entre ambos disolventes hasta llegar a una situación de equilibrio; finalmente las dos fases líquidas inmiscibles se separarán en el embudo de decantación, quedando en la fase inferior, la el líquido de mayor densidad.

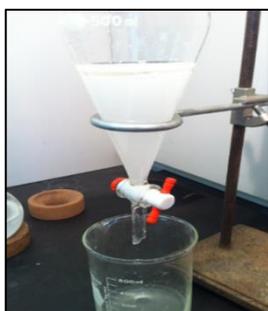


Figura 15. Proceso de lavado

La relación de las concentraciones del compuesto A en cada disolvente, a una temperatura dada, es una constante llamada **coeficiente de reparto** (K). Para un mismo compuesto, el coeficiente de reparto depende de la temperatura y del par de disolventes considerados.

Solubilidad de A en 2 > Solubilidad de A en 1.

$$K = \frac{[A]_2}{[A]_1} \approx \frac{\text{Solubilidad de A en el disolvente 2}}{\text{Solubilidad de A en el disolvente 1}}$$

Donde $[A]_1$ y $[A]_2$ son las concentraciones en el equilibrio del compuesto A en los disolventes 1 y 2, respectivamente. Realizando una aproximación puede considerarse que la concentración del compuesto A en cada disolvente se correlaciona con la solubilidad de dicho compuesto en el disolvente puro; por lo tanto el éxito en una extracción depende de la solubilidad relativa del compuesto a extraer en el par de disolventes elegidos.⁽³³⁾

Orden de las fases

En los procesos de extracción o lavado, donde se utiliza la disolución acuosa y otra orgánica, el orden de las fases depende de sus densidades relativas. La mayor parte de las disoluciones acuosas que se utilizan en los procesos de lavado contienen un 5-10% de soluto.

Como norma general, para evitar errores irrecuperables, no se debe descartar ninguna de las fases hasta que no se esté seguro de cuál es la que interesa, y que el producto se ha extraído por completo; si existe duda a la hora de decidir cuál es la fase acuosa y cuál es la orgánica, la siguiente prueba puede resultar de gran utilidad:

1. Separar la fase inferior y añadir una pequeña cantidad de agua a la fase que ha quedado en el embudo, independientemente de su naturaleza.
2. Dependiendo de que dicha fase sea acuosa u orgánica, tras la adición de agua se observarán en el embudo una o dos fases. Si la que quedaba inicialmente en el embudo fuera orgánica, aparecerán dos fases; en tal caso, separar la pequeña cantidad de agua añadida. Si fuera acuosa, se observará una sola fase, y el haber añadido una pequeña cantidad de agua sólo habrá producido una ligera dilución.⁽³³⁾

3.9.2 Extracción de aceites esenciales

La extracción de aceites esenciales de origen natural, se realiza de diversas formas, en función de la calidad del aceite por extraer y de la estabilidad de sus constituyentes, ya

que en la mayoría de los casos, éstos tienden a degradarse cuando se someten a altas temperaturas u otro tipo de tratamiento extremo. La extracción de aceites esenciales se realiza fundamentalmente por tres métodos:

- Destilación con agua: La planta sólo se pone en contacto con agua, es común para la extracción de aceites con propiedades medicinales.
- Destilación por corriente de vapor: La parte de la planta se pone en contacto directo con vapor y los aceites esenciales se colectan como mezcla aceite/agua.
- Destilación con solventes: El aceite se extrae en un solvente, mismo que después debe ser separado.

Otros métodos empleados para extraer aceites esenciales de las plantas son: Enfleurage y fluidos supercríticos. (34)

3.9.3 Destilación por rotavapor

Una de las tareas más frecuentes en un laboratorio de productos naturales consiste en la eliminación de un disolvente orgánico (de bajo punto de ebullición) de una disolución formada por dicho disolvente y un producto orgánico no volátil que queremos aislar. Según lo visto hasta el momento, un aparato de destilación sencilla nos serviría para realizar la separación del disolvente si los puntos de ebullición son lo suficientemente distintos.



Figura 16. Aparato de rotavapor

Sin embargo, no es necesario montar el aparato de destilación para resolver este problema dado que casi todos los laboratorios están dotados de un aparato llamado rotavapor, que

no es más que un destilador a vacío que lleva incorporado un motor, lo que permite el giro del matraz de destilación (ver figura 16), por tanto la destilación continua de su contenido; para generar vacío puede emplearse una trompa de agua o una bomba de membrana, ya que ambas proporcionan el vacío adecuado.⁽³²⁾

3.9.4 Destilación por corriente de vapor

El aislamiento y concentración de aceites esenciales a partir de las plantas ha tenido un gran impacto en el desarrollo de la química relacionada con la medicina, la alimentación y la cosmética. La capacidad de dilucidar la estructura del componente activo de un aceite esencial ha permitido desarrollar métodos de síntesis de estos compuestos a partir de otros fácilmente asequibles, llegándose así, a veces, a versiones más económicas de los mismos.

Uno de los procesos habituales para la extracción de estos compuestos es la llamada destilación en corriente de vapor. Se trata de una técnica importante con muchas aplicaciones comerciales, que permite separar sustancias insolubles en agua y ligeramente volátiles de otros productos no volátiles mezclados con ellos, mediante un proceso de codestilación con agua (ver figura 17).

Si en una mezcla existen dos o más compuestos que cumplen estas características, normalmente no se separan unos de otros, pero sí de todo lo demás. Con esta técnica se separan productos naturales a temperaturas inferiores a sus puntos de ebullición, por lo que se evita su descomposición, y es especialmente útil cuando los compuestos están contaminados con otras sustancias que sí son solubles en agua.

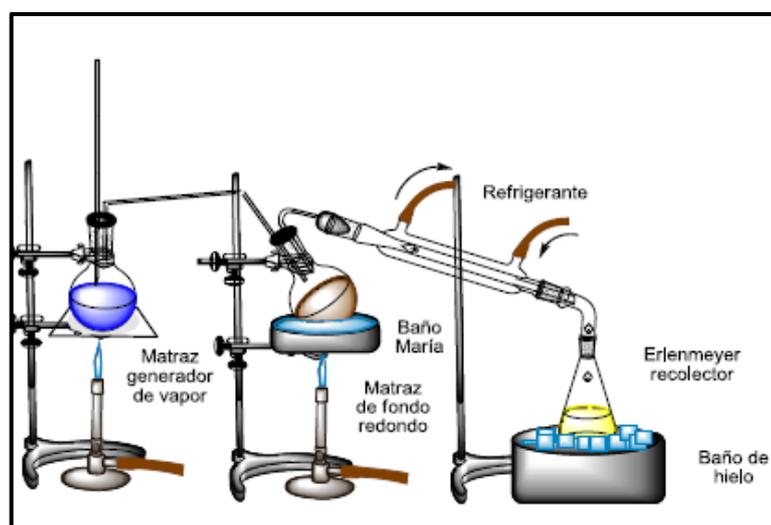


Figura 17. Aparato de destilación por corriente de vapor

Para comprender el fundamento de la destilación en corriente de vapor hay que considerar cómo se comporta en la destilación un sistema compuesto por dos líquidos inmiscibles. Cada uno de ellos ejerce su propia presión de vapor característica, independientemente de la del otro.

Por tanto, la presión de vapor total será:

$$P_T = P_A + P_B \text{ (a la temperatura T)}$$

Si se trata de agua y un compuesto orgánico que queremos aislar:

$$P_T = P_{\text{agua}}^{\text{obs}} + P_{\text{org}}^{\text{obs}} = X_{\text{agua}} P_{\text{agua}}^{\circ} + X_{\text{org}} P_{\text{org}}^{\circ}$$

El punto de ebullición de la mezcla será aquella temperatura a la que la presión de vapor total iguale a la exterior. A menos que la presión de vapor del compuesto sea 0, la temperatura de ebullición de la mezcla será inferior a 100 °C. Puesto que, a una temperatura dada, la presión ejercida por un gas es proporcional a su concentración, en el punto de ebullición de la mezcla las presiones de vapor de sus componentes serán proporcionales a sus concentraciones y por tanto:

$$(P_{\text{agua}} V) / (P_{\text{org}} V) = (n_{\text{agua}} RT) / (n_{\text{org}} RT)$$

$$P_{\text{agua}} / P_{\text{org}} = n_{\text{agua}} / n_{\text{org}} = (\text{masa}_{\text{agua}} / 18) (\text{masa}_{\text{org}} / PM_{\text{org}})$$

De estas ecuaciones se deduce que al destilar una mezcla de dos líquidos no miscibles, las cantidades relativas en peso de los dos líquidos que se recogen en el colector están relacionadas con los pesos moleculares y las tensiones de vapor, y que la mezcla destilará a temperatura constante mientras esté presente una mínima cantidad de ambos compuestos.⁽³²⁾

3.9.5 Extracción con fluidos supercríticos

En 1869 Thomas Andrews (1813-1885) realizó un estudio sistemático del equilibrio de fases del dióxido de carbono. Sus experimentos demostraron que la zona de equilibrio líquido-vapor disminuye a medida que aumenta la presión hasta que ambas se encuentran en un punto característico de cada sustancia, denominado punto crítico.

Se entiende por Fluido Supercrítico (FSC) a una sustancia llevada a condiciones operativas de P, T cercanas al punto crítico. Un fluido supercrítico es cualquier sustancia cuya temperatura y presión son más altas que sus valores críticos y su densidad aproximada o mayor que su densidad crítica.

El método de extracción con fluidos supercríticos, es de desarrollo más reciente, el material vegetal cortado en trozos pequeños, o molido, se empaca en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un fluido en estado supercrítico (por ejemplo CO₂), las esencias son así solubilizadas y arrastradas por el fluido supercrítico, que actúa como solvente extractor, se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente.

Finalmente se obtiene una esencia cuyo grado de pureza depende de las condiciones de extracción. Aunque presenta varias ventajas como rendimiento alto, es ecológicamente compatible, el solvente 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.⁽³²⁾

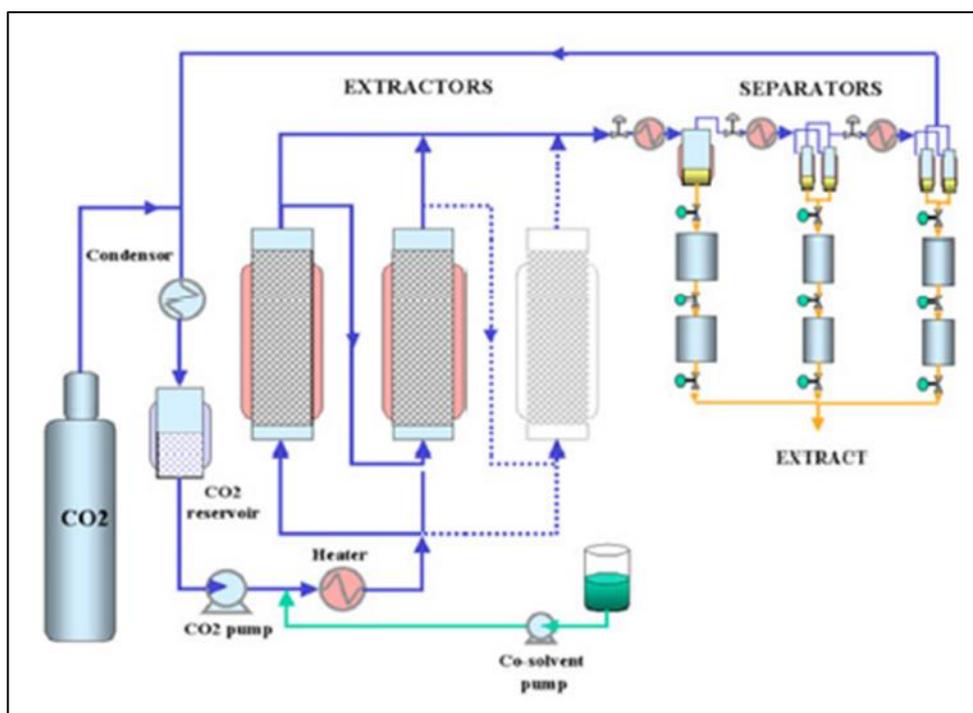


Figura 18. Esquema extracción con fluidos supercríticos

En esta condición la sustancia no es ni líquido ni gas, pero posee las propiedades de ambas y representa un estado de la materia en el cual ésta es compresible pero posee una densidad similar a la de un líquido. Además puede resumirse en cuatro pasos principales: Extracción, expansión, separación y compresión del solvente. Éste es el disolvente

idóneo a emplear dado que no es tóxico, ni inflamable, ni corrosivo, ni contaminante, y es químicamente inerte, barato, abundante y fácilmente obtenible en diversos grados de pureza. Por otra parte, a diferencia de los disolventes orgánicos utilizados en la actualidad, el CO₂ se separa de los extractos por descompresión, pasando a estado gaseoso con lo que no deja rastro en el producto extraído (ver figura 18).

Finalmente, el dióxido de carbono se puede usar a temperaturas y presiones que son relativamente bajas, seguras y particularmente apropiadas para la extracción de una gama de compuestos más volátiles y termolábiles. Estas propiedades son particularmente significativas cuando se comparan con la seguridad, toxicidad y coste creciente de operación y las restricciones legales de los disolventes tradicionales en alimentación, tales como el hexano y el diclorometano.⁽³³⁾

3.10 Generalidades de la cromatografía

Introducción

La cromatografía es una técnica que permite la separación de los componentes de una mezcla debido a la influencia de dos efectos contrapuestos:

a). Retención:

Efecto ejercido sobre los componentes de la mezcla por una fase estacionaria, que puede ser un sólido o un líquido anclado a un soporte sólido.

b). Desplazamiento:

Efecto ejercido sobre los componentes de la mezcla por una fase móvil, que puede ser líquido o un gas.

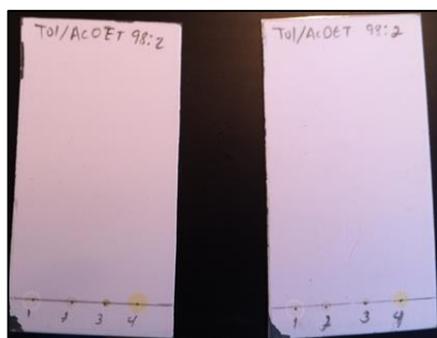


Figura 19. Placas cromatograficas de capa fina analítica

La mezcla a separar se deposita sobre la fase estacionaria y la móvil atraviesa el sistema desplazando a los componentes de la mezcla a distinta velocidad, dependiendo de la

magnitud de sus interacciones relativas con ambas fases (ver figura 19); la repetición sucesiva de las operaciones elementales de retención y desplazamiento a lo largo del sistema cromatográfico da lugar a la separación de la mezcla original. (32). El fenómeno de migración de los componentes de una mezcla a lo largo de la fase estacionaria, impulsados por la móvil, recibe el nombre de **elución**.

La cromatografía puede emplearse para conocer el número de componentes de una mezcla y su identificación, por comparación con patrones (cromatografía analítica). También se aplica a la separación de mezclas de compuestos, tanto a pequeña como a gran escala, y como método de purificación (cromatografía preparativa).

3.10.1 Tipos de cromatografía

Dependiendo de la naturaleza de la fase estacionaria (sólida o líquida) y de la fase móvil (líquida o gaseosa), se pueden distinguir distintos tipos de cromatografía:

a). Cromatografía sólido-líquido:

La fase estacionaria es un sólido y la fase móvil un líquido.

b). Cromatografía líquido-líquido:

La fase estacionaria es un líquido anclado a un soporte sólido y la fase móvil un líquido.

c). Cromatografía líquido-gas:

La fase estacionaria es un líquido no volátil impregnado en un sólido y la fase móvil un gas.

d). Cromatografía sólido-gas:

La fase estacionaria es un sólido y la fase móvil un gas.

Por otra parte en función del tipo de soporte empleado para la fase estacionaria, se puede establecer otra clasificación:

a). Cromatografía en capa fina:

Una capa de adsorbente de espesor uniforme se deposita sobre una placa de vidrio, aluminio o plástico.

b). Cromatografía en columna:

El adsorbente se deposita en el interior de una columna de vidrio.

3.10.2 Cromatografía analítica en capa fina

La fase estacionaria (adsorbente) se encuentra depositada, formando una capa fina de espesor uniforme (0.1-0.2 mm), sobre una placa de vidrio, plástico, o una lámina metálica. La mezcla a analizar se deposita a una pequeña distancia del borde inferior de la placa y se introduce en una cubeta que contiene la fase móvil (eluyente), la cual asciende a lo largo de la placa por capilaridad, desplazando a los componentes a diferentes velocidades, lo que provoca su separación (ver figura 20). Cuando el frente del disolvente se encuentra próximo al extremo superior de la placa, ésta se saca de la cubeta, se deja secar y se procede a la visualización de las manchas.

a). Determinación del R_f

La relación entre las distancias recorridas por un compuesto dado y por el disolvente, desde el origen del cromatograma, se conoce como R_f y tiene un valor constante para cada compuesto en unas condiciones cromatograficas determinadas (adsorbente, disolvente, tamaño de la cubeta, temperatura, etc.). Debido a que es prácticamente imposible reproducir exactamente dichas condiciones experimentales, la comparación de una muestra con otra se debe realizar eluyendo ambas en la misma placa.



Figura 20. Extracción de la placa cromatografía analítica

Para calcular el R_f , se aplica la siguiente fórmula:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto}}{\text{Distancia recorrida por el disolvente}}$$

La distancia recorrida por el compuesto se mide desde el centro de la mancha. Si ésta es excesivamente grande (diámetro mayor de 4 mm) se obtendrá un valor erróneo del R_f .

Por el contrario los compuestos poco polares se desplazan a mayor distancia del origen. La polaridad del disolvente también influye en el valor del R_f . Así, para un mismo compuesto, un incremento en la polaridad del disolvente aumentará su desplazamiento en la placa y, por tanto su R_f .

b). Elección del eluyente

Se recomienda elegir un disolvente en el que los componentes de la mezcla presentan un R_f medio en torno a 0.3-0.5. La búsqueda del eluyente idóneo requiere probar con varios disolventes de diferentes polaridades o con mezclas. Cuando un compuesto eluye a un R_f inferior a 0.2 o superior a 0.7, puede ocurrir que lo que parece un compuesto único sea en realidad una mezcla de varios. En estos casos se debe cambiar a otro disolvente más o menos polar, respectivamente.

Para compuestos poco polares, que se desplazan del origen con mucha facilidad, se debe utilizar un disolvente apolar como el hexano. En el caso de compuestos de polaridad media, se aconseja utilizar mezclas hexano/acetato de etilo en distintas proporciones. Los productos más polares, que quedan muy retenidos en el adsorbente, requieren un disolvente más polar como el metanol o las mezclas cloruro de metileno/ metanol en distintas proporciones.

c). Visualización del cromatograma

La mayor parte de las placas de cromatografía llevan un indicador fluorescente que permite la visualización de los compuestos activos a la luz ultravioleta (254 nm). El indicador fluorescente absorbe luz UV y emite luz visible, generalmente verde (ver figura 21). La presencia de un compuesto activo en el ultravioleta evita que el indicador absorba luz en la zona en la que se encuentra el producto, y el resultado se traduce en la visualización de una mancha en la placa que indica la presencia de un compuesto.⁽³²⁾



Figura 21. Placas ALUGRAM sílica gel 60 al visualizar bajo la lámpara Ultravioleta

3.10.3 Cromatografía en placa fina preparativa.

La cromatografía preparativa se lleva a cabo en placas de gel de sílice de 1-2 mm de espesor sobre un soporte de vidrio de 20 x 20 cm. Se utiliza para la separación y aislamiento de los componentes de mezclas en cantidades comprendidas entre 100-200 mg (ver figura 22).

Para llevar a cabo una cromatografía preparativa debe seguirse el procedimiento que a continuación se indica:

1. Elegir el disolvente adecuado para llevar a cabo la separación de los componentes de la mezcla, mediante una prueba en cromatografía analítica en capa fina.
2. En la superficie del adsorbente, trazar una línea recta con un lápiz (no utilizar tinta) a 1.5 cm del borde inferior de la placa. Marcar con suavidad, sin levantar el adsorbente.
3. Disolver la muestra.
4. Utilizando una pipeta Pasteur, depositar de modo continuo la mezcla disuelta a lo largo de la línea previamente marcada. Para ello, apoyar ligeramente la pipeta con la disolución sobre el adsorbente y dejar evaporar el disolvente. Repetir esta operación hasta sembrar toda la mezcla.
5. Introducir la placa en posición vertical en la cubeta que, durante la elución, debe permanecer tapada, para evitar la evaporación del disolvente, y no moverse.
6. El disolvente ascenderá por capilaridad. Cuando el frente llegue a poca distancia del borde superior de la placa, abrir la cubeta, sacar la placa y dejarla secar.
7. Si los compuestos no son coloreados, visualizarlos a la luz UV.
8. Marcar con una cuchilla el contorno del compuesto a aislar.
9. Con ayuda de una espátula, desprender del soporte de vidrio la gel de sílice con el compuesto absorbido y transferirlo a un Erlenmeyer.
10. Añadir un disolvente en el que el compuesto a aislar sea muy soluble y agitar la mezcla en una placa de agitación.
11. Filtrar la gel de sílice y eliminar el disolvente a presión reducida.

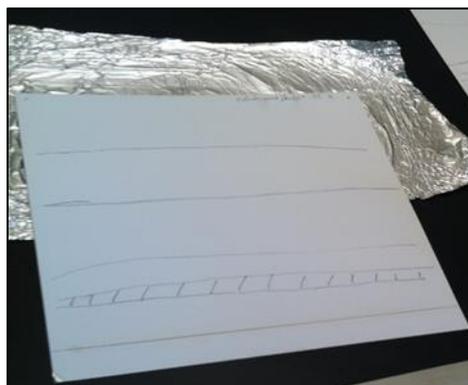


Figura 22. Placas ALUGRAM sílica gel 60 marcando el contorno de los compuestos a aislar (Trans-anetol y Anisaldehído).

3.10.4 Cromatografía en columna

Es el método más general para la separación y purificación de compuestos orgánicos, sólidos o líquidos, a escala preparativa.

La fase estacionaria (adsorbente) se deposita en el interior de una columna de vidrio que termina en un estrechamiento con una llave, y se impregna con la fase móvil (eluyente). La mezcla a separar se deposita sobre la parte superior de la fase estacionaria, y la fase móvil atraviesa el sistema (ver figura 23).

Los compuestos eluidos, disueltos en la fase móvil, van saliendo de la columna y se recogen en fracciones. Los menos polares, que son los que se retienen poco en el adsorbente, son los primeros en salir. Los polares quedan más retenidos y para su elución generalmente es necesario incrementar la polaridad del disolvente. El tiempo necesario para eluir un compuesto de la columna recibe el nombre de tiempo de retención.⁽³²⁾

El adsorbente más utilizado para cromatografía en columna es la gel de sílice. La alúmina y florisil (silicato magnésico) se emplean como sustitutos de la gel de sílice cuando ésta es incompatible con la mezcla a cromatografiar.

La elución de la cromatografía puede realizarse por gravedad o a media presión (cromatografía Flash). En este último caso se conecta la cabeza de la columna a un espesor de media presión o a una línea de aire comprimido. El tamaño de la partícula de gel de sílice para cromatografía a media presión (0.040-0.063 mm, 230-400 mesh) es más

pequeño que el que se utiliza para -0.20 cromatografía se utilizará el método por gravedad (0.063-0.200 mm, 70-230 mesh). Si en gravedad se empleara gel de sílice de tamaño de partícula más pequeño, la elución sería muy lenta y no ocurriría.

Debido a que la disminución del tamaño de partícula del adsorbente conduce a una separación más eficaz, la cromatografía a media presión proporciona generalmente mejores resultados que la cromatografía por gravedad. Antes de llevar a cabo la cromatografía en columna, es necesario elegir el disolvente adecuado para optimizar la separación de los componentes de la mezcla. Esta operación se realiza mediante cromatografía analítica en capa fina.

a). Diámetro de la columna y cantidad de gel de sílice

La altura de la fase estacionaria en la columna está relacionada fundamentalmente con la diferencia de los valores de R_f de los componentes de la mezcla. El diámetro está relacionado, además, con la cantidad de mezcla a separar.



Figura 23. Columna cromatografica

b). Elección del disolvente

Para elegir el disolvente, previamente se lleva a cabo una cromatografía en capa fina de la muestra a analizar. El disolvente tiene que conducir a una buena separación de los componentes de la mezcla en la placa ($\Delta R_f > 0.1$) y situar el componente menos polar a un R_f aproximado de 0.3. La separación de una mezcla en una columna será poco eficaz si se utiliza un disolvente que sitúe los compuestos a separar a un valor de R_f superior a 0.3.

Para columnas pequeñas es mejor utilizar un eluyente menos polar que el obtenido del resultado de la placa.

3.10.5 Cromatografía de gases

La separación en cromatografía de gases se produce como consecuencia de la interacción de los componentes de una mezcla en estado de vapor en una fase móvil gaseosa inerte, con una fase estacionaria que puede ser un sólido (cromatografía gas-sólido) o un líquido de alto punto de ebullición soportado sobre un sólido inerte (cromatografía gas-líquido). Su puesta en práctica requiere un cromatografo de gases.

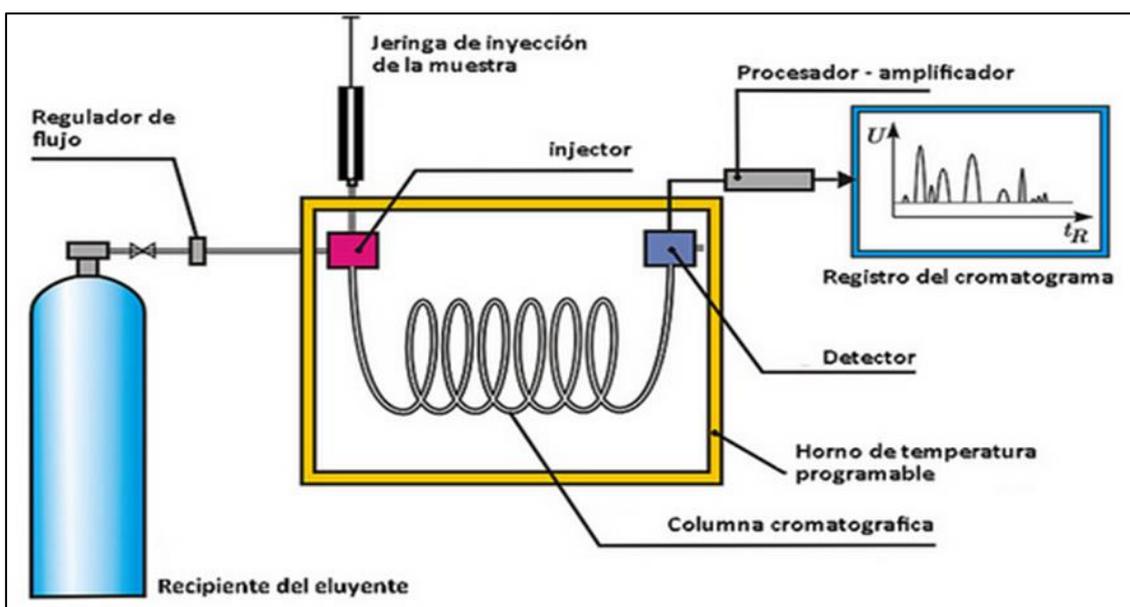


Figura 24. Esquema de un cromatografo de gases y sus componentes básicos

Una mezcla líquida o una disolución se introduce mediante una microjeringa, a través de un septum, en el injector. La muestra se vaporiza en el inyector a una temperatura preseleccionada, y se introduce en un gas portador inerte que la arrastra al interior de la columna, alojada en un horno termostatzado (ver figura 24). Los vapores eluidos pasan por un detector y la información se transforma en una señal eléctrica que llega a un integrador y a un registro gráfico, que proporciona el cromatograma. (35)

Gas portador

Es un gas inerte, por lo general argón, nitrógeno o helio; constituye el medio de transporte de los componentes de la mezcla a través del sistema cromatográfico. Debe cumplir las siguientes características:

- ❖ Ser químicamente inerte y no interactuar con las moléculas de analito ni con la columna.
- ❖ Obtener en un grado de pureza alto (debe estar libre de contaminantes que pueden interactuar con la muestra, degradar la columna o dar señal en el detector) y a un precio razonable.
- ❖ Ser compatible con el sistema de detección empleado.

Columnas

Constituyen el medio donde tiene lugar la separación de los componentes de la mezcla. Deben proporcionar buena selectividad (capacidad de separar compuestos de igual punto de ebullición) y buena eficacia (bandas estrechas). En cromatografía gas-líquido, el mecanismo de separación se basa en la distinta capacidad de los componentes de la mezcla gaseosa para disolverse en la fase líquida (reparto) ver figura 25.

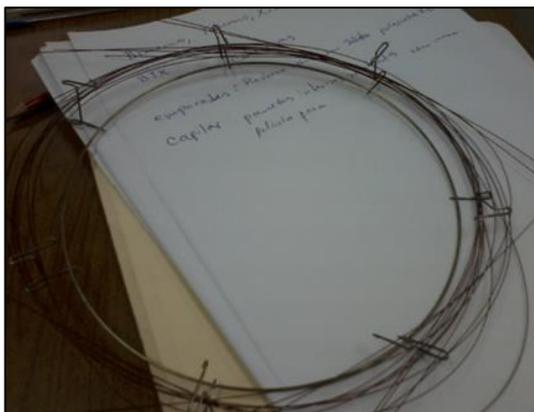


Figura 25. Columna de un cromatografo de gases

Cada compuesto disuelto en la fase estacionaria está en equilibrio con su vapor, por lo que será arrastrado por el gas portador con mayor facilidad cuanto menor sea su afinidad por la fase líquida y cuanto mayor sea su presión de vapor (ver figura 26).

Inyector

El inyector consiste en una cámara termostatazada a una temperatura adecuada para garantizar la vaporización completa del soluto, comunicada con la fuente de gas portador y con la columna, y aislada del exterior mediante septum. La temperatura de inyección debe ser superior al punto de ebullición del componente menos volátil de la mezcla.

La disolución de la muestra se introduce con una microjeringa a través del septum. Con el objetivo de minimizar la discriminación de los componentes de la mezcla en el inyector

y el ensanchamiento de la banda inicial, se recomiendan fundamentalmente dos técnicas para el manejo de la jeringa:

- a) Hot needle; la muestra se aloja en el pistón de la jeringa, quedando la aguja vacía. Ésta se inserta en el inyector y se precalienta durante 3-5 segundos antes de oprimir el émbolo de la jeringa. La mezcla abandona la aguja por evaporación.
- b) Solvent flush o air flush; se toma disolvente o aire en el interior de la jeringa, seguido por la muestra, dejando la aguja vacía. Ésta se inserta en el inyector y se oprime el émbolo. El disolvente o el aire empujan la muestra fuera de la jeringa.



Figura 26 Cromatografo de gases marca Shimadzu modelo GC-2014

Temperatura

La temperatura afecta a la presión de vapor de los solutos y a los coeficientes de actividad de las disoluciones de los solutos en la fase estacionaria líquida. En eluciones isotermas, cuanto mayor es la temperatura, peor es la separación de los componentes de bajo tiempo de retención, al tiempo que se produce un estrechamiento y una disminución del tiempo de retención de los solutos que eluyen al final.

Detector

El detector mide una propiedad del gas portador que se altera en presencia de un soluto. En función de la naturaleza de la detección, se puede considerar universal si responde a la presencia de cualquier compuesto, o selectivo, si responde sólo ante características estructurales particulares. La sensibilidad y especificidad de la detención varían en

función del tipo de propiedad física que se determina. Entre los detectores empleados con mayor frecuencia se encuentran los térmicos, los de ionización y los eléctricos.⁽³⁶⁾

A. Detectores de conductividad térmica (TDC). Es universal y no destructivo. Responde a las diferencias entre la conductividad del gas portador puro, que es nula, y aquél que contiene vapores orgánicos. Su sensibilidad es moderada.

B. Detectores de ionización; son prácticamente universales y altamente sensibles. Responden a la intensidad de la corriente eléctrica que se produce al ionizar el gas eluido. Se distinguen varios tipos en función del modo de generar la corriente de iones:

1. Ionización de llama (FID). Es el más empleado. El gas eluido de la columna se mezcla con hidrógeno y se quema en presencia de aire, provocando la combustión de los compuestos orgánicos presentes lo cual da lugar a iones que generan una corriente eléctrica. La respuesta es proporcional al número de átomos de carbonos reducidos.
2. Captura de electrones (SD). El gas eluyente atraviesa una cámara de ionización donde es bombardeado por una fuente de electrones beta, lo cual da lugar a un plasma formado por iones positivos radicales y electrones térmicos. Estos últimos son capturados aplicando una diferencia de potencial a la célula de ionización, lo que genera una corriente de base. ⁽³⁷⁾

En presencia de un soluto, los electrones térmicos son capturados por estas, dando lugar a un ion molecular negativo o iones de fragmentación. El efecto global conciso en una disminución en la corriente eléctrica de base en presencia de un soluto. La respuesta es muy elevada para hidrocarburos halogenados, compuestos aromáticos nitrados y compuestos conjugados con varios grupos electro aceptores. Sin embargo, es insensible a hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, aminas.⁽³⁷⁾

3. Fotoionización (PID). Una lámpara de descarga que contiene una mezcla de gases de baja presión se excita por un arco eléctrico, dando lugar a la emisión de fotones que son capturados por el gas eluido.

C. Detector de conductividad eléctrica. Se lleva a cabo una pirolisis oxidativa o reductora de los gases eluidos, lo cual da lugar a la descomposición de solutos en fragmentos de bajo peso molecular. A la salida del horno de pirolisis, los

fragmentos gaseosos se unen con un disolvente, y la mezcla pasa a una célula de conductividad eléctrica.

3.10.6 Introducción en técnicas acopladas

Para el análisis de muestras complejas es frecuente separar previamente los constituyentes por una técnica cromatográfica en interfase con el espectrómetro de masas. El acoplamiento de un cromatografo de gases y un espectrómetro de masas GC/MS (ver figura 27).

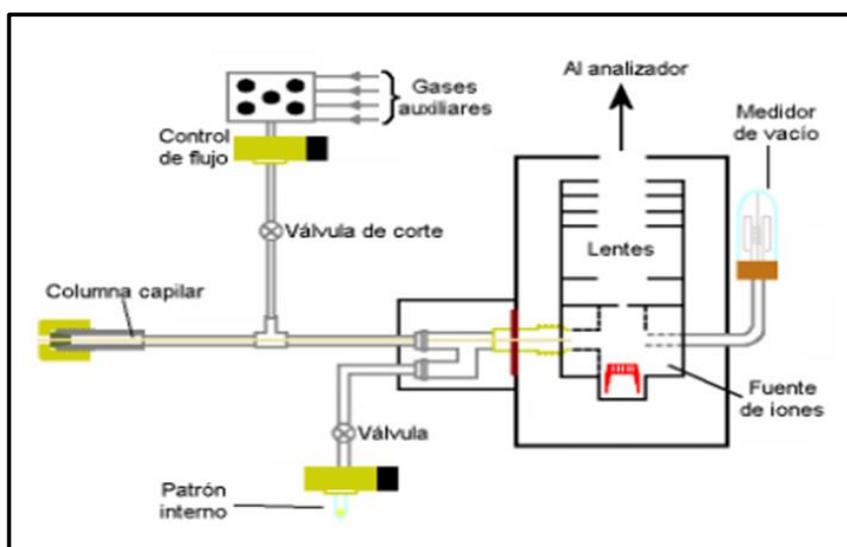


Figura 27. Esquema de acoplamiento de un cromatografo de gases y un espectrómetro de masas GC/MS

Es sencillo: se hace desembocar la columna capilar en la cámara de ionización. Los compuestos puros llegan, por lo tanto, en forma gaseosa y son analizados uno detrás de otro. Las bombas del espectrómetro son suficientes para mantener el vacío necesario en el análisis, el flujo del gas portador en la columna no sobrepasa uno o dos mL/min.

La interfase HPLC/MS o CE/MS es más compleja como consecuencia de la presencia de disolventes de elución que a menudo contienen agua (un veneno para los espectrómetros de masas). En cromatografía líquida son deseables el uso de microcolumnas en las que los caudales son muy pequeños.⁽³⁸⁾

3.10.7 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

El acoplamiento GC-MS es una técnica acoplada la combinación de dos sistemas independientes. Conocida como métodos de dos dimensiones, la primera dimensión, el

cromatógrafo de gases, dispersa solutos de acuerdo con sus diferencias de presión de vapor. La segunda dimensión en GC-MS, el espectrómetro de masas, actúa como un detector pero con poder de resolución independiente añadido. Se ioniza y los fragmentos de los componentes de la muestra; se dispersan este proceso se representa mediante una gráfica de retención masa-carga.⁽³⁹⁾

La Cromatografía de gases acoplada a la espectroscopia de masas es una técnica analítica poderosa, que permite la separación de los componentes de una muestra en el tiempo y brinda estructural acerca de los analitos eluidos. Se utilizan como criterios de identificación la información de los tiempos e índices de retención junto con la información estructural, patrones de fragmentación, obtenidos a partir de los espectros de masas de los analitos que eluyen de la columna cromatografica e ingresan al sistema de detección (espectrómetro de masas).

Los aceites esenciales tienen una química compleja que consiste en hidrocarburos terpénicos, alcoholes, aldehídos, y ésteres. Los componentes varían desde los muy volátiles a semi-volátiles y de no polar a los componentes orgánicos altamente polares. El uso de cromatografía de gases como una herramienta de separación es por lo tanto ideal, para los aceites esenciales. Esto es la razón por la cual, por ejemplo los análisis de petróleo más importantes se realizan con esta técnica acoplados.

La identificación completa de componentes de aceites esenciales es posible con el uso de estándar interno. También el uso de los índices de retención de la literatura o por comparación con bases de datos de espectrometría de masas. El uso de patrones auténticos es sobre todo útil cuando el analista tiene una idea acerca de la composición de la muestra en cuestión.

Por otro lado, el uso de tiempos de retención y los índices de “Kovat” requiere el uso de las mismas condiciones de análisis, incluyendo mismos datos de temperatura. El uso y el éxito de las bases de datos de espectrometría dependen de la calidad y la cantidad de datos almacenados. Los problemas surgen cuando las muestras analizadas contienen componentes no incluidos en la base de datos.

Casi todos los estudios relacionados con los aceites esenciales que emplean la técnica GC-MS en la literatura científica se centran principalmente en los componentes de aceite. Sólo pocas publicaciones se ocupan de los factores que afectan el rendimiento de aceite y la variación de la concentración de algunos componentes del petróleo. ⁽⁴⁰⁾

3.11 ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL

Con el propósito de identificar los compuestos que han sido aislados, se describen a continuación los métodos espectroscópicos empleados en esta investigación a fin de establecer su estructura, estos métodos son: Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y ^{13}C y Espectrometría de Masas.

3.11.1 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Es un fenómeno físico basado en las propiedades magnéticas que poseen los núcleos atómicos. La RMN permite alinear los campos magnéticos de diferentes núcleos atómicos en la dirección de un campo magnético externo (ver figura 28). La respuesta a este campo externo depende del tipo de núcleos atómicos, por lo que esta técnica puede utilizarse para obtener información sobre una muestra.

Algunos núcleos atómicos sometidos a un campo magnético externo absorben radiación electromagnética en la región de las radiofrecuencias. Como la frecuencia exacta de esta absorción depende del entorno de estos núcleos, se puede emplear para determinar la estructura de la molécula en donde se encuentran éstos; Los átomos más abundantes en los compuestos orgánicos, H y C, se pueden observar fácilmente con cantidades no muy grandes de muestra. Puesto que en cada caso se pueden sacar conclusiones sobre el entorno próximo (e incluso lejano) a cada átomo, se puede llegar a deducir la estructura de dichos compuestos. (41).

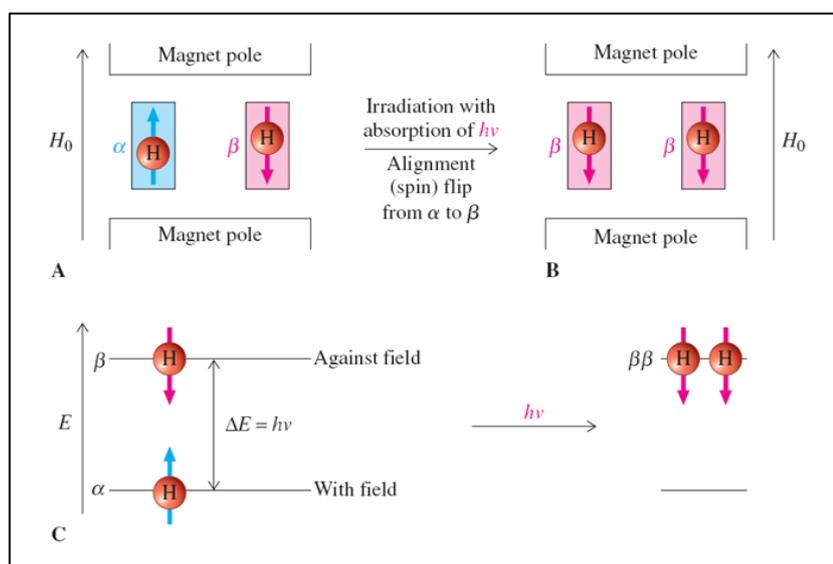


Figura 28. Esquema de Resonancia Magnética Nuclear; (A). En un campo magnético externo los protones se alinean sobre la misma (con menor energía α) y en contra

(mayor energía β) del campo que difieren energía. (B). Se irradia con energía y pasa el spin nuclear de un protón del estado de σ al estado β . (C). Diagrama de energía, mostrando un protón cuando gana la energía $\Delta E = h\nu$ y sometidos a "giro spin" de σ a β .

Además de los átomos de H y C, se pueden observar otros átomos, siempre que haya abundancia suficiente (en función de la sensibilidad de cada uno de ellos) de un isótopo magnéticamente activo (momento magnético); por ejemplo algunos isótopos magnéticamente activos sensibles a la RMN son ^{15}N , ^{19}F , ^{11}B , ^{29}Si , ^{207}Pb y ^{31}P , cuya relevancia radica en que también están presentes en las biomoléculas. (42)

La aplicación más importante de la espectroscopia de RMN (ver figura 29), es la determinación estructural de moléculas orgánicas, organometálicas, estereoquímicas y/o biológicas.

Para ello es necesaria la realización de diferentes tipos de experimentos de los cuales se obtiene una determinada información; para la elucidación estructural de moléculas orgánicas, organometálicas y bioquímicas de los experimentos más utilizados son RMN ^1H y ^{13}C (DEPT 90, DEPT 135), **homonucleares** (COSY, DQFCOSY, NOESY, ROESY) y **heteronucleares** (HSQC, HMQC, HMBC, TOCSY).

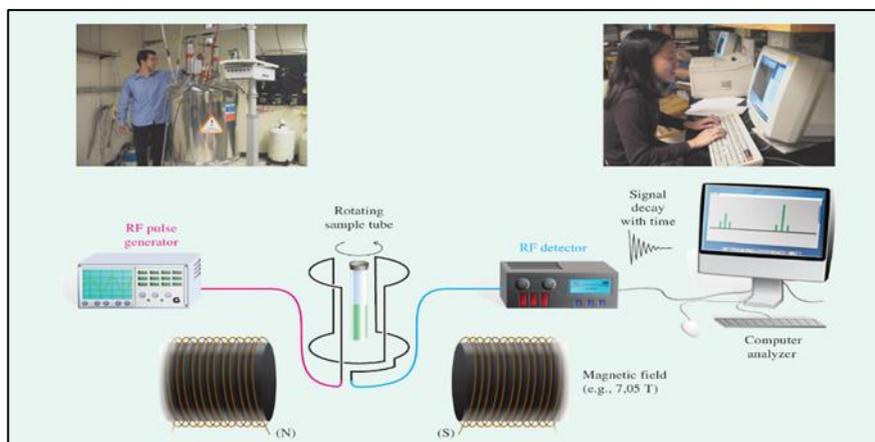


Figura 29. Esquema del procesamiento de una muestra en un espectrómetro de RMN.

3.11.2 Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y ^{13}C

Es importante el uso de estas técnicas en la presente investigación, porque proporcionará información sobre el número y tipo de entidades químicas presentes en las moléculas de aceites extraídos.

1. Espectro de RMN de ^1H (figura 30): Proporciona información del número y tipo de hidrógenos diferentes que hay en la molécula. La posición en el espectro

(desplazamiento químico) determina el entorno químico del núcleo, y por tanto da información de grupos funcionales a los que pertenecen o que están cerca. La forma de la señal da información de los protones cercanos acoplados escalarmemente.

(42)

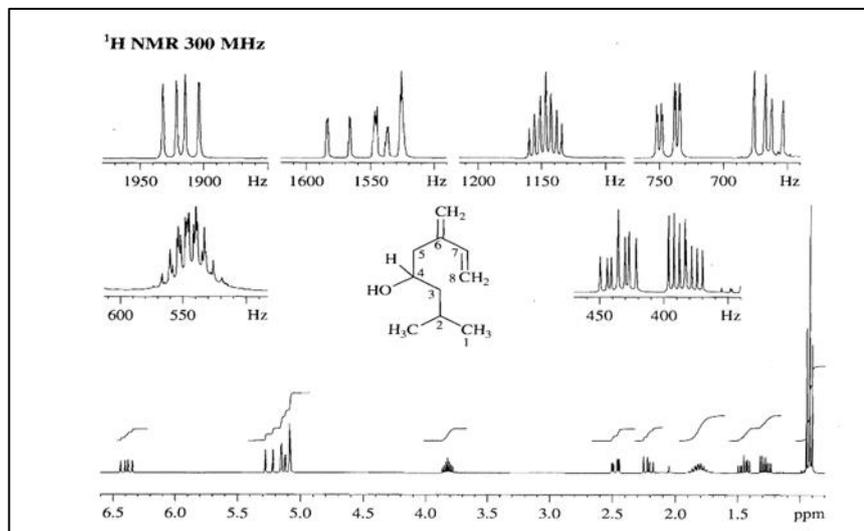


Figura 30 Espectro de RMN de ^1H .

- Espectro de RMN de ^{13}C (ver figura 31): Al igual que en ^1H el desplazamiento químico da información de los grupos funcionales. Dependiendo del tipo de experimento realizado se puede obtener información del número de carbonos que lo conforman, así como el tipo de carbono; primario, secundario, terciario y cuaternario.(42)

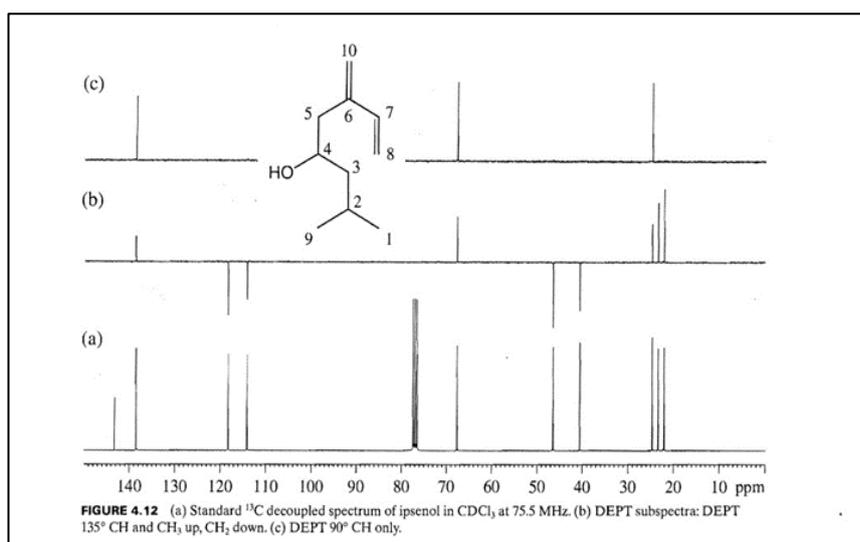


Figura 31. Espectro de RMN de ^{13}C

3.11.3 Principios de la espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una técnica instrumental que permite efectuar la elucidación estructural de sustancias utilizando una pequeña cantidad de muestra, sin separación o purificación previa. Para ello hace uso de las propiedades de partículas cargadas, iones, que son más rápidas y fáciles de medir (deflexión en campos magnéticos y/o eléctricos, enfoque por cuádruplo, tiempo de vuelo del ion que las de las partículas neutras (figura 32).

Esta técnica data de 1910 y surge como consecuencia del estudio de tubos de rayos catódicos. En ese momento comienzan sus aplicaciones, utilizando sistemas de ionización por impacto electrónico y posteriormente por fotones y utilizando analizadores magnéticos y eléctricos para moléculas en fase gaseosa, cuyo peso molecular no superara los 800 μ 1. Las moléculas de interés, forman parte generalmente de una mezcla heterogénea que no requiere necesariamente una separación previa, y se someten en primer lugar a una fuente de ionización donde se ionizan adquiriendo carga negativa o positiva. Los iones atraviesan el analizador de masas hasta que alcanzan diferentes partes del detector de acuerdo con su relación masa/carga m/z (es la relación de la masa de un ion y la carga que soporta).

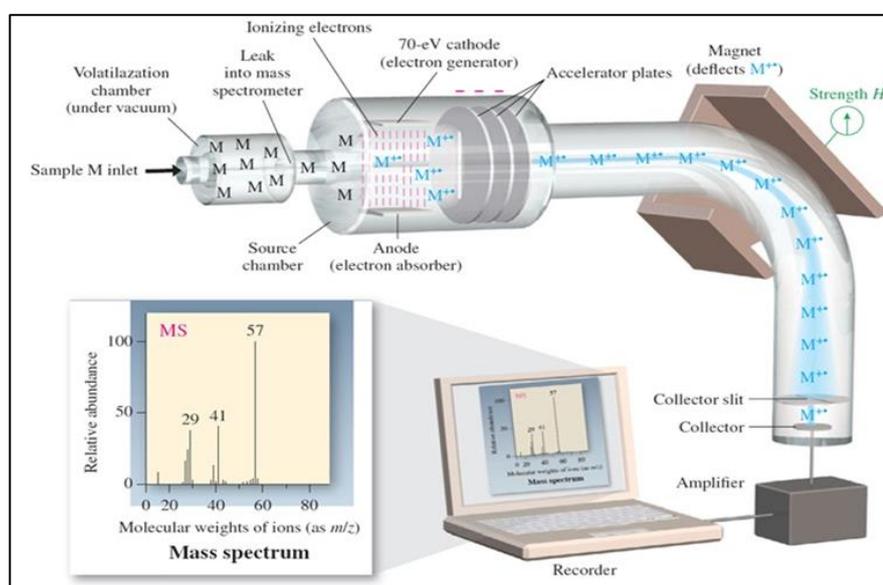


Figura 32. Esquema del procesamiento de una muestra en un espectrómetro de masas.

Una vez en contacto con el detector, se generan señales que son registradas en el sistema informático y representadas en un espectro de masas que muestra la abundancia relativa de las señales en función de su relación m/z (ver figura 33).⁽⁴³⁾

De todas las herramientas analíticas de que dispone el científico, la espectroscopia de masas es la de mayor aplicación, en el sentido de que esta técnica es capaz de proporcionar información acerca de:

1. Composición elemental de las muestras (proporciona la Formula Molecular de un compuesto desconocido).
2. Es determinante en la clarificación estructural de las moléculas inorgánicas, orgánicas y biológicas
3. Composición cualitativa y cuantitativa de mezclas complejas
4. Relaciones isotópicas de átomos en las nuevas muestras

Además permite identificar y determinar estructuras, así como analizar trazas de moléculas en una mezcla química, obteniendo así la masa molecular y la abundancia de los componentes de dicha mezcla y permite estudiar interacciones no covalentes como el análisis de la unión proteína-ligando, con los cuales podemos identificar los ligandos específicos o determinados receptores.

La muestra introducida al equipo sufre una fragmentación generando iones, estos son pasados al analizador de masas y al detector para posteriormente analizar las señales obtenidas.⁽⁴³⁾

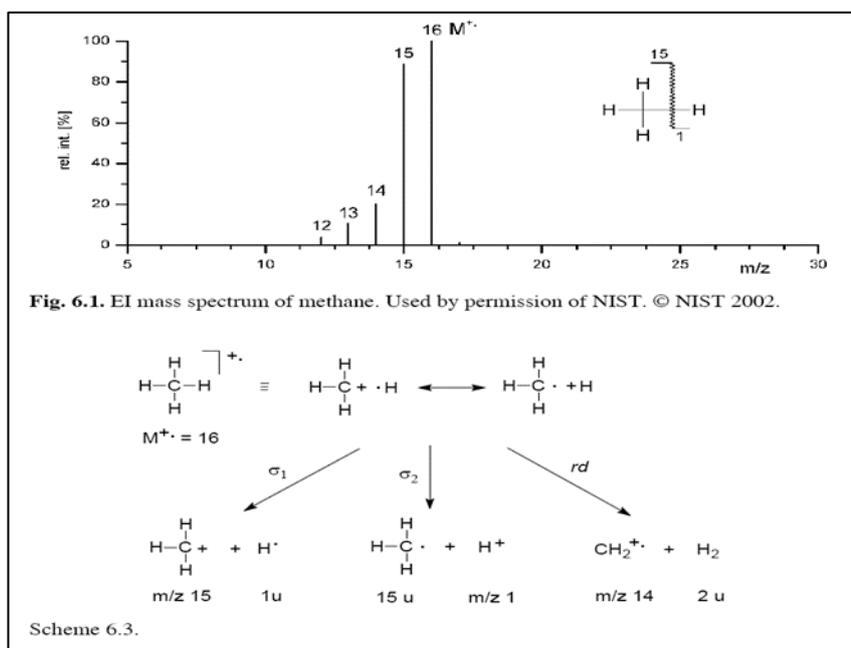


Figura 33. Espectro de masas.



CAPITULO IV

DISEÑO MEDOLÓGICO

4.0 DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 TIPO DE ESTUDIO

Este trabajo de investigación comprende el procedimiento experimental-analítico y descriptivo para determinar la composición química de distintas fuentes de aceites esenciales, con propiedades organolépticas similares. Tres de las fuentes de estos aceites esenciales tienen estudios experimentales previos; mientras que dos, no tienen antecedentes de estudios en el país.

La metodología para el desarrollo del presente trabajo se divide en tres partes.

4.2 INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA

Se realizó la consulta de libros, revistas científicas, tesis y manuales de laboratorio. Esta revisión se realizó en la Biblioteca Central de la Universidad de El Salvador, Biblioteca de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Biblioteca de la Facultad de Química y Farmacia, Biblioteca de la Facultad Multidisciplinaria Oriental y la Biblioteca del Herbario del Jardín Botánico La Laguna.

Las revistas científicas que fueron consultadas en la red incluyen: *Phytochemistry*, *Journal of Natural Products*, *Phytochemical Analysis* y *Flavour and Fragrance Journal*, a través del acceso al Sistema HINARI.

4.3 INVESTIGACIÓN DE CAMPO

Las plantas estudiadas pertenecen a las familias:

- a) *Piperáceas*, con la especie *Piper marginatum Jacq*
- b) *Asteraceas*, con la especie *Tagetes filifolia Lag*
- c) *Umbelíferas*, con la especie *Pimpinella anisum*.
- d) *Schisandraceas*, con la especie *Illicium verum*.
- e) *Umbelíferas*, con la especie *Foeniculum vulgare*

4.3.1 *Piper marginatum* Jacq

Las partes aéreas del *Piper marginatum* Jacq, se recolectaron en el bosque del balneario “Los Chorros”, Jurisdicción de Colón, Departamento de La Libertad, en febrero de 2015 (ver figura 34).

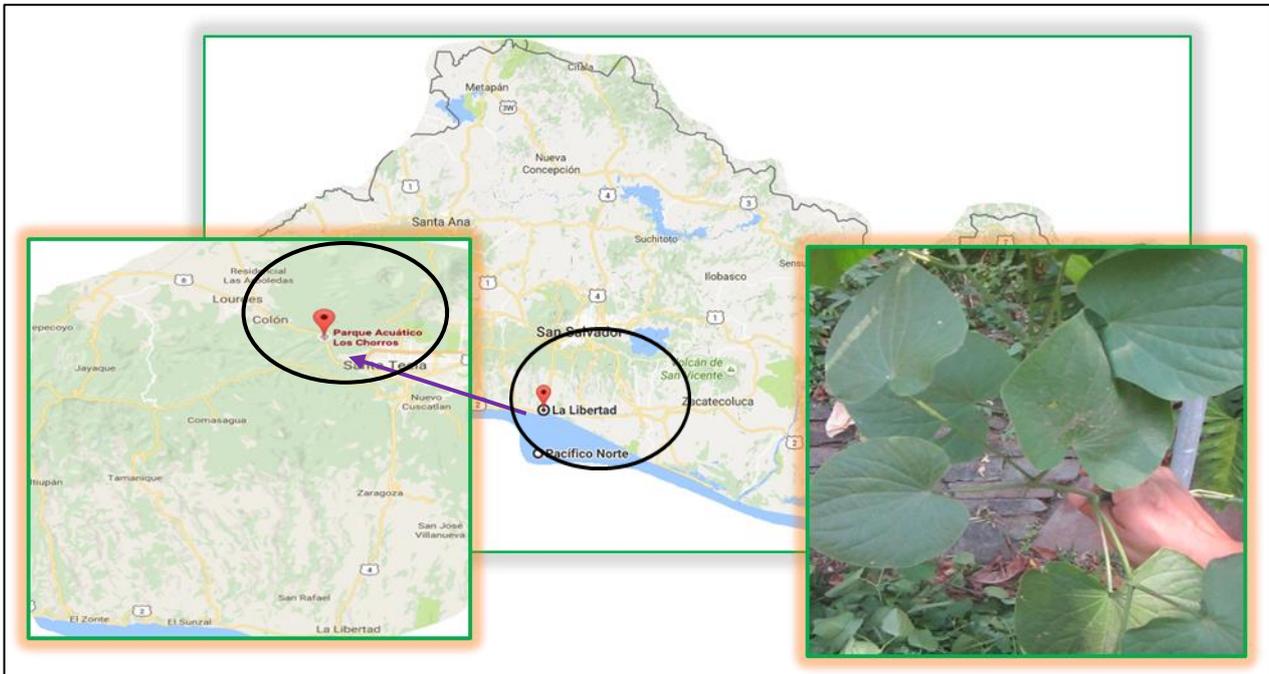


Figura 34. Zona de recolección *Piper marginatum* Jacq

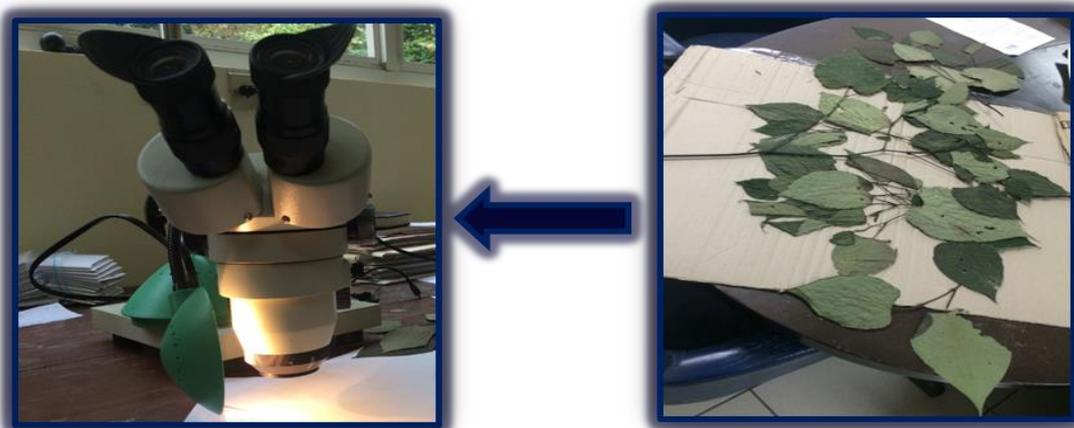


Figura 35. Especimen de *Piper marginatum* Jacq presentado en el Herbario del Jardín Botánico La Laguna

Se presentó una muestra de la especie, en el Herbario del Jardín Botánico La Laguna para su identificación por un botánico y curador. Un espécimen fue depositado en el Herbario del Jardín Botánico La Laguna (ver figura 35 y anexo 1).

4.3.2 *Tagetes filifolia* Lag

Las partes aéreas de *Tagetes filifolia* Lag, se recolectaron a la orilla de la “Laguna de Alegría”, Cantón San Juan, Jurisdicción Alegría, Departamento Usulután, en octubre de 2015 (ver figura 36). Se presentó una muestra de la especie, en el Herbario del Jardín Botánico La Laguna para su identificación por un botánico y curador. Un espécimen fue depositado en el Herbario del Jardín Botánico La Laguna (ver anexo 2).

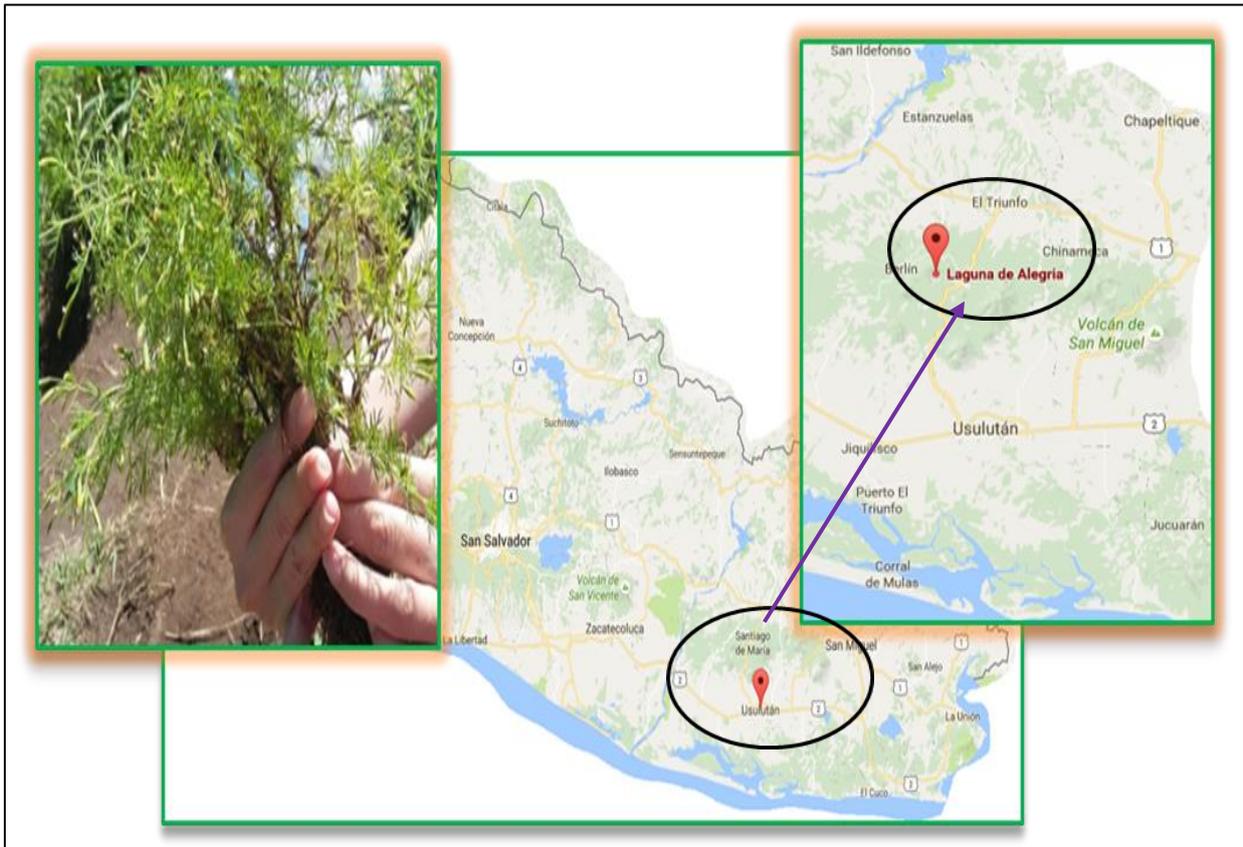


Figura 36. Zona de recolección *Tagetes filifolia* Lag

4.3.3 *Pimpinella anisum*, *Illicium verum* y *Foeniculum vulgare*

Las semillas de *Pimpinella anisum*, *Illicium verum* y *Foeniculum vulgare* fueron adquiridas en el mercado municipal de la Ciudad de San Miguel en agosto de 2014 (ver figura 37).



Figura 37. Lugar donde se compraron las semillas de *Pimpinella anisum*, *Illicium verum* y *Foeniculum vulgare*

4.4 INVESTIGACIÓN DE LABORATORIO

La parte experimental, se realizó en los siguientes laboratorios:

- Laboratorio de Polímeros de la Escuela de Química de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la Universidad de El Salvador.
- Laboratorio de investigación de la Escuela de Química de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la Universidad de El Salvador
- Laboratorio del grupo de investigación de la Dra. Ana Estévez, del Instituto de Bio-orgánica “Antonio González” de la Universidad de La Laguna, Tenerife, España.

4.4.1 Destilación por corriente de vapor

Se pesaron 500.00 g de semillas de *Pimpinella anisum*, 50.00 g de semillas de *Illicium verum* y 50.00 g de semillas de *Foeniculum vulgare*, (cada una por separado ver figura 38), y se trasladaron a un mortero, se pulverizaron con ayuda de un pistilo, seguidamente el pulverizado de cada especie, se pasó a otro matraz que contenía la mitad de agua, este se calentó hasta ebullición para producir vapor. Después de calentar durante cuatro horas, se obtuvo el aceite esencial mezclado con agua. Se suspendió el calentamiento cuando se

obtuvo un volumen de destilado de 100-150 mL. El equipo de destilación por corriente de vapor permitió la separación de sustancias insolubles en agua y ligeramente volátiles en este caso el aceite esencial.



Figura 38. Especies vegetales antes del proceso de extracción: *Foeniculum vulgare*, *Tagetes filifolia* Lag y *Piper marginatum* Jacq

4.4.2 Extracción con disolventes

La mezcla de aceite esencial y agua que se obtuvo, se sometió al proceso de extracción, colocándola en un embudo de separación para aislar ambas fases (ver figura 39). A la fase orgánica se le agregaron 30 mL Tolueno para su separación completa y se colectó en un matraz Erlenmeyer. La fase acuosa se descartó.



Figura 39. Proceso de extracción de: *Illicium verum*, *Foeniculum vulgare*, *Pimpinella anisum* y *Piper marginatum* Jacq

Por otra parte, para obtener el aceite esencial de *Piper marginatum* Jacq y *Tagetes filifolia* Lag se realizó la extracción líquido-líquido directamente a las partes aéreas colectadas,

extrayendo con eter de petroleo. Se pesó 31.2 g de *Piper marginatum* Jacq y 107.46 g de *Tagetes filifolia* Lag.

4.4.3 Eliminación de disolvente a presión reducida

El aceite recuperado se colocó en un matraz de fondo redondo para someterlo a destilación a presión reducida en un rotaevaporador (ver figura 40), donde el matraz se sumergió parcialmente en un baño de agua a una temperatura de 60 °C, en condiciones de baja presión y 120 revoluciones por minuto. El disolvente se recolectó en un matraz para ser reutilizado.

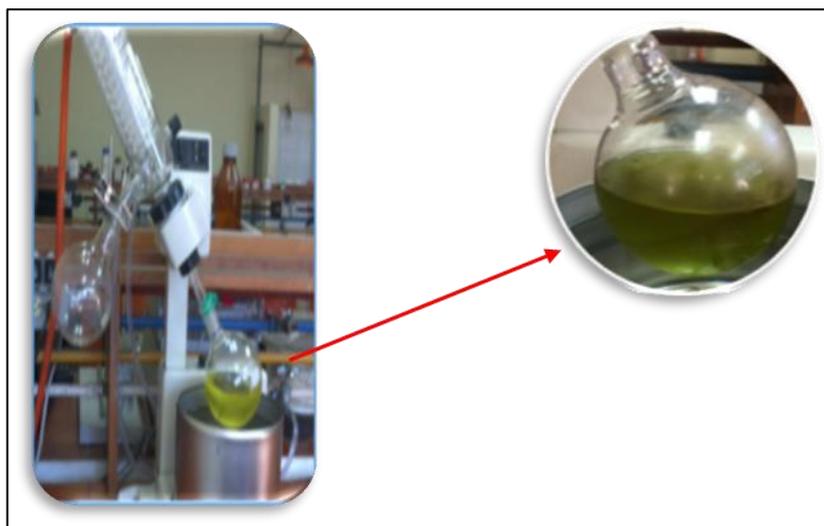


Figura 40. Rotavaporando la mezcla

4.4.4 Secado

Para secar el aceite, se colocó algodón a un embudo de vidrio, se agregó la cantidad necesaria de sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua remanente, con una pipeta de Pasteur se pasó poco a poco el aceite esencial recuperado hacia el embudo; se colectó en un vial y se guardó en refrigeración (ver figura 41).



Figura 41. Proceso de secado

4.4.5 Identificación de *trans*-anetol y anisaldehído por cromatografía en capa fina analítica.

Se tomó una muestra de aceite esencial seco y se aplicó sobre placas ALUGRAM Sílica gel 60 con indicador fluorescente, UV 254 de 20 x 20 cm y 0.2 mm de espesor, se eluyó

con una mezcla de disolventes Ciclohexano/AcOET 80:20. Se visualizan tres compuestos bajo la lámpara Ultravioleta (ver figura 42), se marcaron y por sus valores de R_f , se identificaron preliminarmente como *trans*-anetol (R_f 0.7), alil-anisol (R_f 0.55) y Anisaldehído de (R_f 0.5). Esto por comparación con patrones puros.

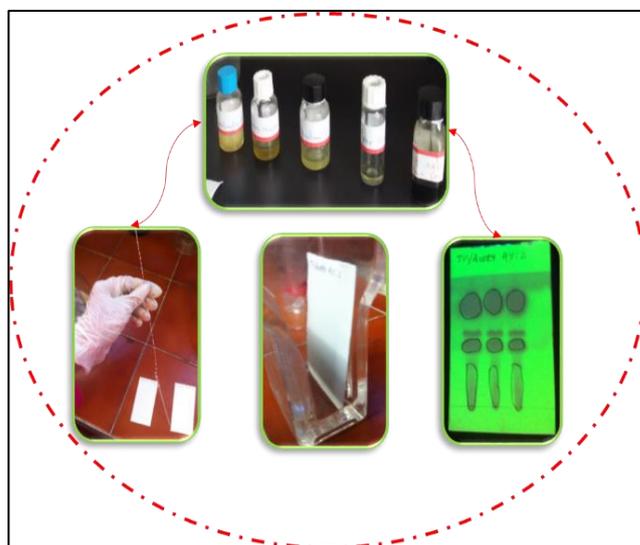


Figura 42. Proceso de cromatografía en capa fina analítica

4.4.6 Aislamiento de *trans*-anetol y anisaldehído por cromatografía en capa fina preparativa.

El aislamiento de *trans*-anetol y anisaldehído se realizó por cromatografía en capa fina preparativa, bajo las mismas condiciones que las empleadas para la cromatografía en capa fina analítica.



Figura 43. Placas cromatográficas de capa fina preparativa.

La muestra se aplicó con una pipeta a lo largo de la línea base de la placa, cuidando de no aplicar en exceso y se dejó secar antes de eluir, luego la placa se eluyó con Ciclohexano/AcOET 98:2 hasta que el disolvente alcanzó tres cuartos de la placa (ver figura 43). Luego se raspó de la placa (ver figura 44), dos bandas coloreadas visibles a la

luz ultravioleta. Las dos bandas de Sílica gel impregnadas de los dos compuestos mayoritarios, se filtraron por separado en un embudo de vidrio fritado, lavándolo sucesivas veces con disolvente de la fase móvil, acetato de etilo concentrado y acetona concentrada.



Figura 44. Proceso de raspado de los metabolitos mayoritarios en cromatografía en capa fina preparativa

4.4.7 Identificación de *trans*-anetol y anisaldehído

La identificación de los dos compuestos aislados, se realizó por espectroscopia de Infrarrojo (IR) y por espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Protón y de Carbono (RMN ^1H y ^{13}C). Se obtuvieron los espectros de IR y RMN ^1H , ^{13}C , de ambos compuestos aislados. La elucidación estructural se efectuó mediante la revisión de las bandas de IR características para cada compuesto; así mismo, se examinaron las señales que se desdoblán a diferentes desplazamientos químicos en los espectros de RMN ^1H , ^{13}C y se compararon con las señales descritas en la bibliografía (10). La descripción completa de la elucidación estructural para *Trans*-anetol se encuentra en el apartado 5.1.

Los espectros IR se obtuvieron utilizando una gota del compuesto. El equipo empleado fue un espectrofotómetro marca Avatar 330 FT-IR Thermo Nicolet. Para los espectros de RMN ^1H y ^{13}C , los compuestos se disolvieron en Cloroformo Deuterado (CDCl_3) y sus espectros se obtuvieron en un espectrofotómetro marca Bruker AMK 500 (500 MHz para ^1H y 125 MHz para ^{13}C).

4.4.8 Cuantificación de *trans*-anetol por Cromatografía de Gases (GC)

La cuantificación de *trans*-anetol en los aceites esenciales, se realizó mediante la relación entre las áreas a una determinada concentración para cada extracto y las áreas obtenidas

de una curva de calibración construida con un patrón de *trans*-anetol, disuelto en *n*-hexano en el rango de concentraciones de 0.1-0.4 mg/g. La descripción detallada de la cuantificación de *trans*-anetol en las muestras, se encuentra en el apartado 5.2.2.



Figura 45. Proceso de inyección manual en el cromatografo de gases y Cromatografo de gases marca Shimadzu modelo GC-2014

Los cromatogramas se obtuvieron utilizando un cromatógrafo de gases marca Shimadzu modelo GC-2014 (ver figura 45) provisto de una columna capilar ALLTEC-1 (25 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μm de espesor). Se utilizó Nitrógeno como gas portador a un flujo de 3 mL/min, con un volumen de inyección de 1 μL de relación de Split de 20:1. Temperatura inicial: 50 $^{\circ}\text{C}$ (3 min); temperatura final: 250 $^{\circ}\text{C}$ (10 min); tiempo total de análisis 20 minutos; temperatura del inyector 270 $^{\circ}\text{C}$; temperatura del detector 270 $^{\circ}\text{C}$.

4.4.9 Esquemas de trabajo para la obtención y análisis de aceites esenciales.

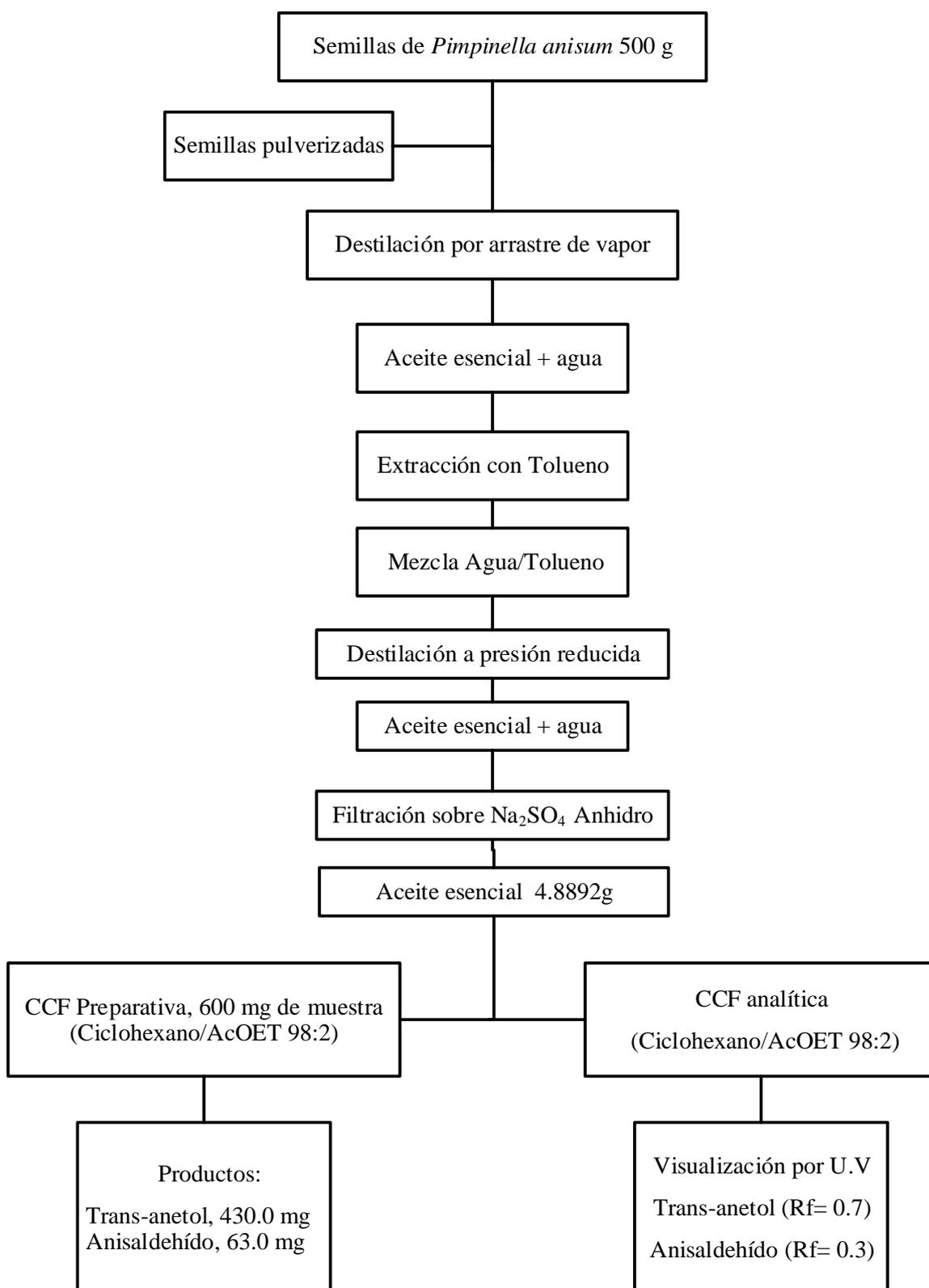


Figura 46. Esquema de trabajo para semillas de *Pimpinella anisum*



Figura 47. Esquema de trabajo para semillas de *Illicium verum*



Figura 48. Esquema de trabajo para semillas de *Foeniculum vulgare*

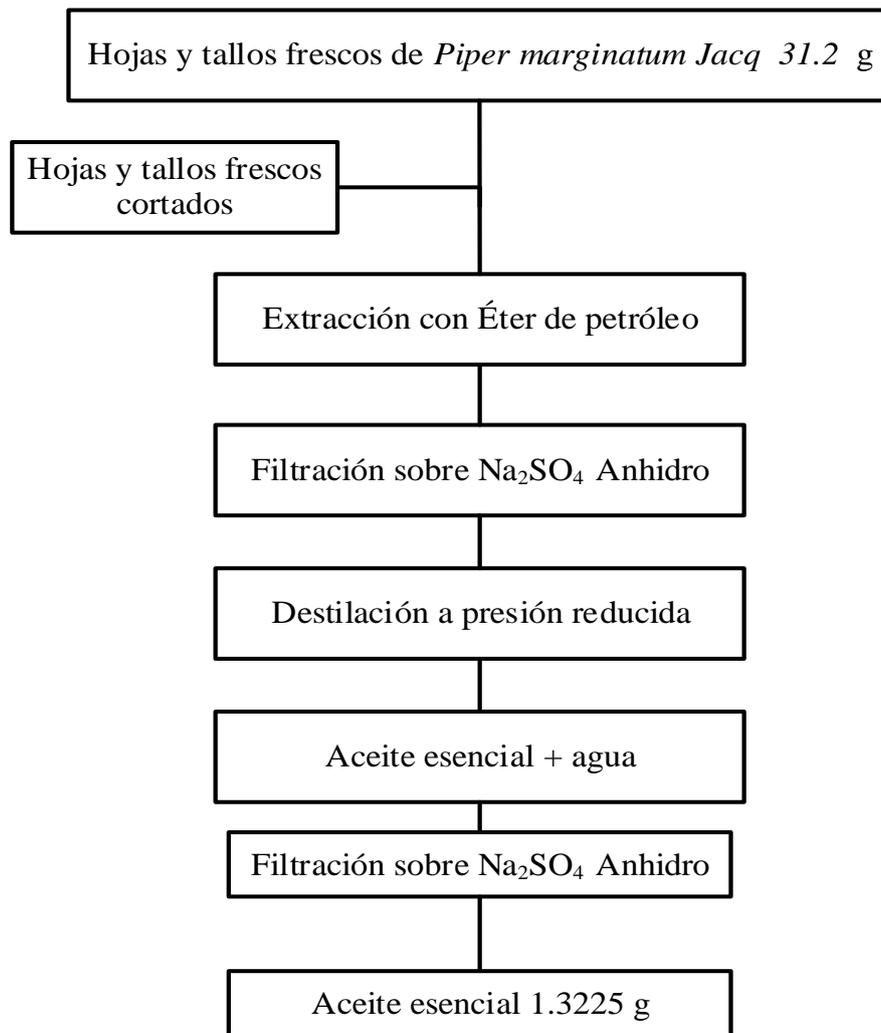


Figura 49. Esquema de trabajo para Hojas y tallos frescos de *Piper marginatum Jacq*

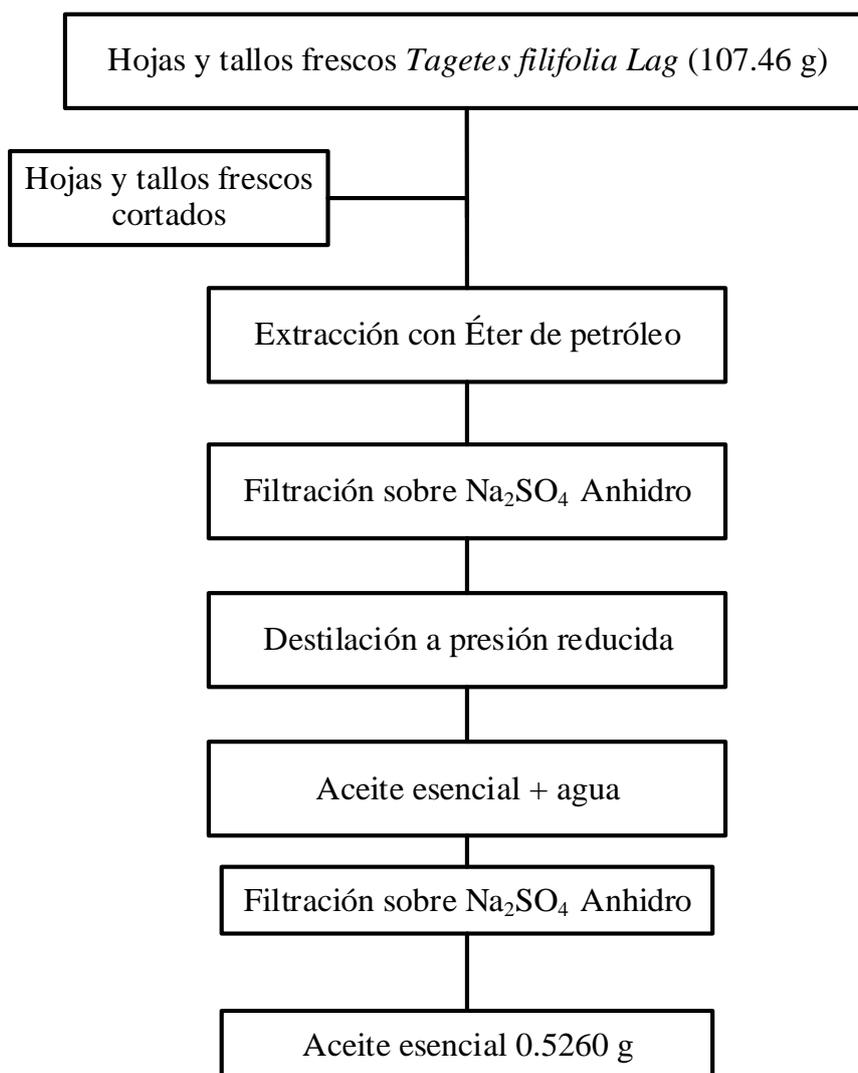
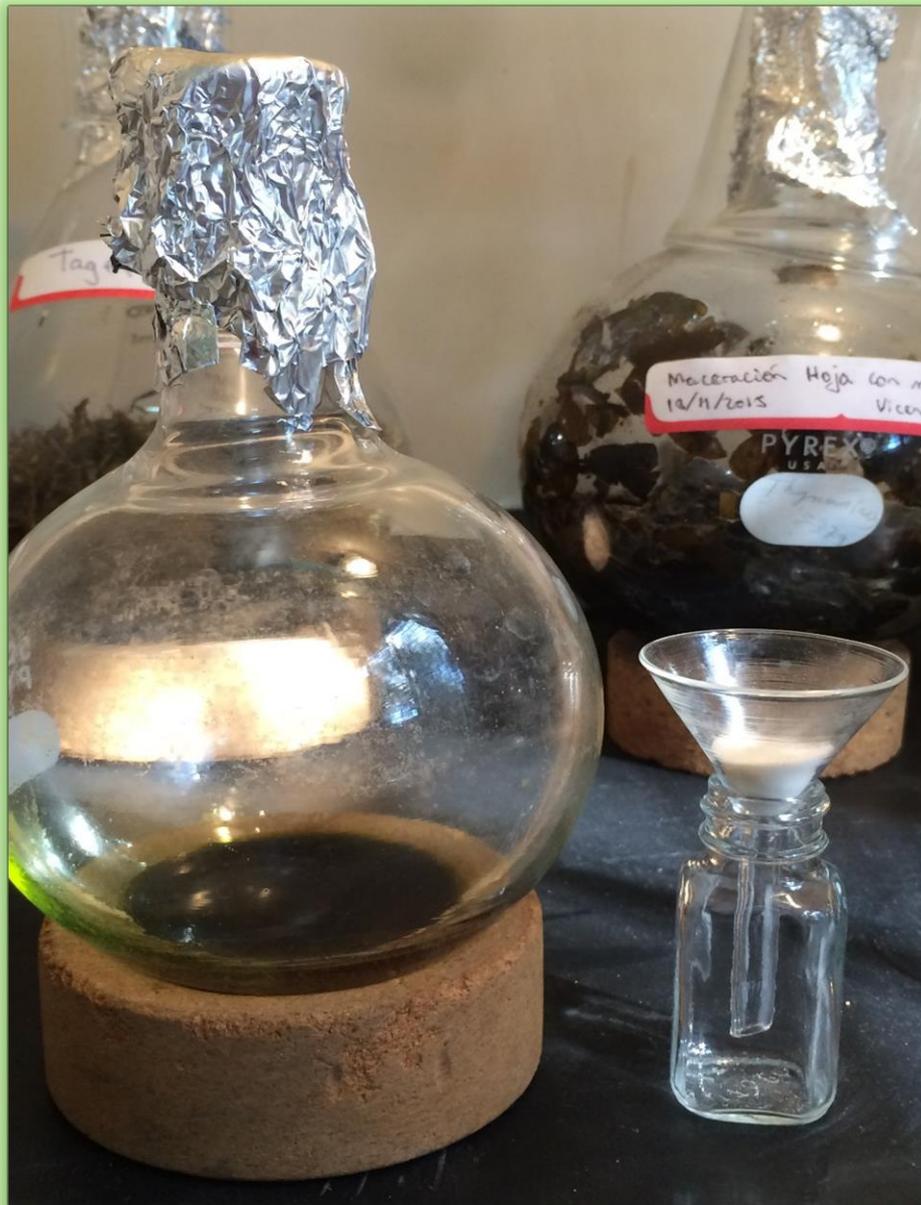


Figura 50. Esquema de trabajo para Hojas y tallos frescos de *Tagetes filifolia* Lag



CAPITULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Con base en los fundamentos descritos en los capítulos precedentes y siguiendo los objetivos trazados para este trabajo de investigación, pasamos a describir la elucidación estructural del *trans*-anetol.

Después de repetidas cromatografías en capa fina analítica y cromatografías en capa fina preparativa, utilizando como fase móvil la mezcla de disolventes *n*-hexano/acetato de etilo, se aisló e identificó de los aceites esenciales, el metabolito mayoritario *trans*-anetol.

5.1 ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL

Las estructuras de los dos metabolitos aislados, fueron elucidadas mediante técnicas espectroscópicas de IR y RMN de ^1H y ^{13}C . A continuación pasamos a describir la elucidación estructural del compuesto aislado, mediante ambos métodos.

5.1.1 Espectroscopia de Infrarrojo

El espectro IR (figura 51) muestra bandas de características de enlaces C-H de tipo sp^3 y sp^2 en torno a 3150 3050 cm^{-1} . Para el anillo aromático, se observan sobretonos entre 2100 y 1700 cm^{-1} . El pico a 1600 cm^{-1} , es debido a la vibración C=C; y la banda a 840 cm^{-1} indica un anillo aromático *p*-disustituido. En la región de la huella dactilar a 1250 cm^{-1} , se observa la vibración C-O-C que corresponde a un éter aromático.

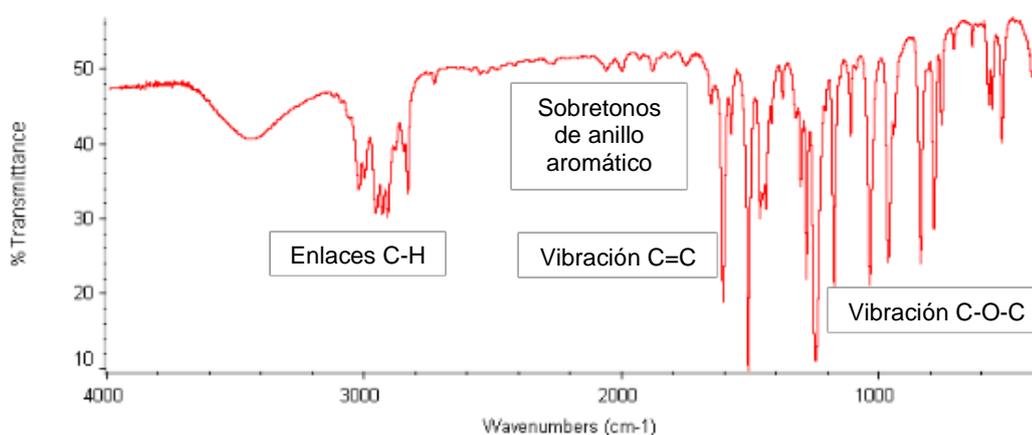


Figura 51. Espectro de Infrarrojo de *trans*-anetol.

5.1.2 Resonancia Magnética Nuclear de ^1H , ^{13}C y 2D HSQC.

El espectro de RMN de ^1H (Figura 52), muestra siete señales distintas, que corresponden a los doce protones de la molécula de *trans*-anetol.

En primer lugar, a δ 7.28 y 6.86 ppm, se observan dos dobletes que muestran “efecto tejado”, el cual es típico de un sistema de spin $\text{AA}'\text{XX}'$ y que representa a cuatro protones de un anillo aromático *p*-disustituido. Así también a δ 6.37 y 6.12 ppm se observan dos señales que integran para un protón cada una, las cuales pertenecen a un patrón de desdoblamiento característico de dos protones vinílicos en posición *-trans*, que queda demostrado por su constante de acoplamiento de $J=15.6$ Hz. Por otra parte, a δ 3.81 ppm, aparece un singulete que integra para tres protones, el que, dada su forma y desplazamiento químico, corresponde a un grupo metoxilo. A δ 1.88 ppm aparece un doblete que integra para tres protones, que, dado su desplazamiento químico, pertenece a un grupo metilo alifático en posición vecinal a uno de los dos protones vinílicos. Finalmente, a campo alto, δ 1.30 se observa una señal como singulete, que integra para 2H, lo cual corresponde a una cadena alifática de una cera presente en la muestra de aceite.

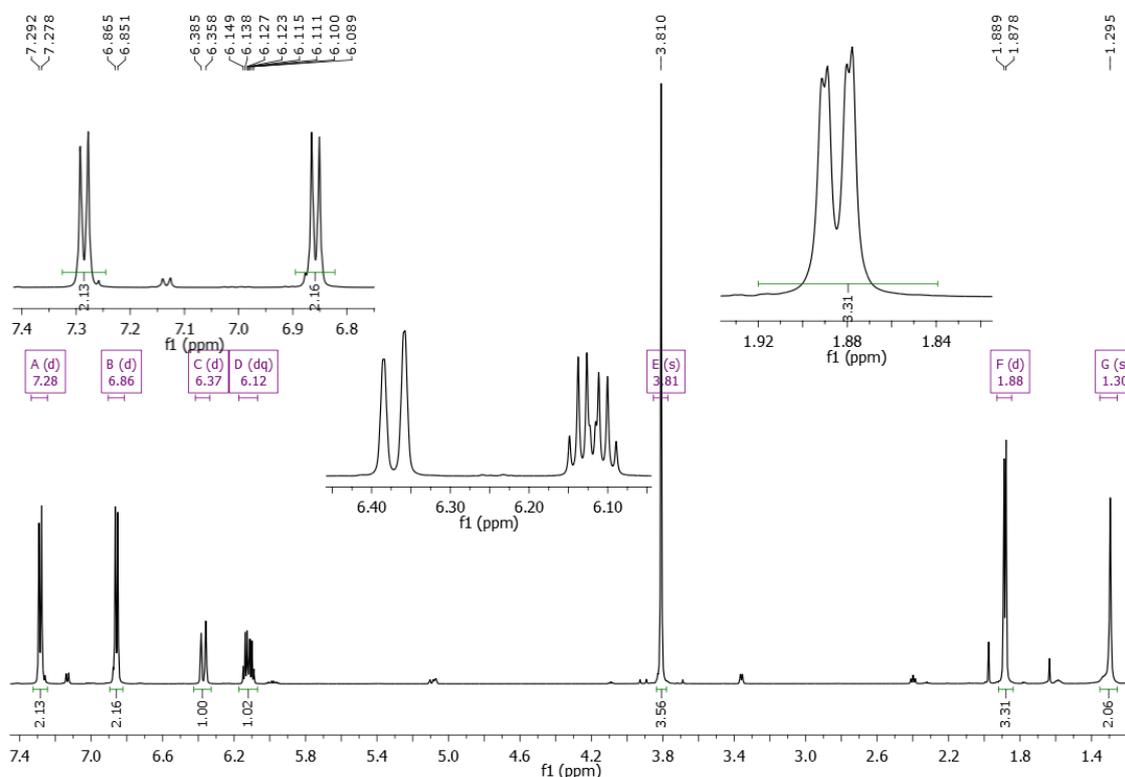


Figura 52. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 500 MHz) que muestra el desplazamiento químico, la forma y desdoblamiento de las señales y su integración.

Elucidación estructural de *trans*-anetol con base en el espectro de RMN de ^1H .

La descripción de la estructura de *trans*-anetol por RMN de ^1H , se basa en la presencia de un anillo aromático que tiene dos sustituyentes en posición *para*- dado que existe un sistema de spin AA'XX' de cuatro protones del anillo aromático *p*-disustituido (Figura 53). Uno de los sustituyentes es el grupo metoxilo ($-\text{OCH}_3$), que aparece como un singlete a δ 3.81 ppm. El otro sustituyente, es una cadena insaturada que incluye: Un grupo metilo a δ 1.88 ppm (d, $J = 6.7$ Hz); un protón vinílico que acopla con el grupo metilo, δ 6.12 (dq, $J = 15.6, 6.6$ Hz); más otro protón vinílico, δ 6.37 ppm (d, $J = 16.6$ Hz), cuyo valor de la constante J , indica que tiene un acoplamiento de tipo *trans*- con el primer protón vinílico. De tal forma que, el segundo sustituyente del anillo aromático, es una cadena insaturada de tipo $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_3$. Esto permitió la asignación completa de los protones de la molécula, tal como se presenta en la figura 53.

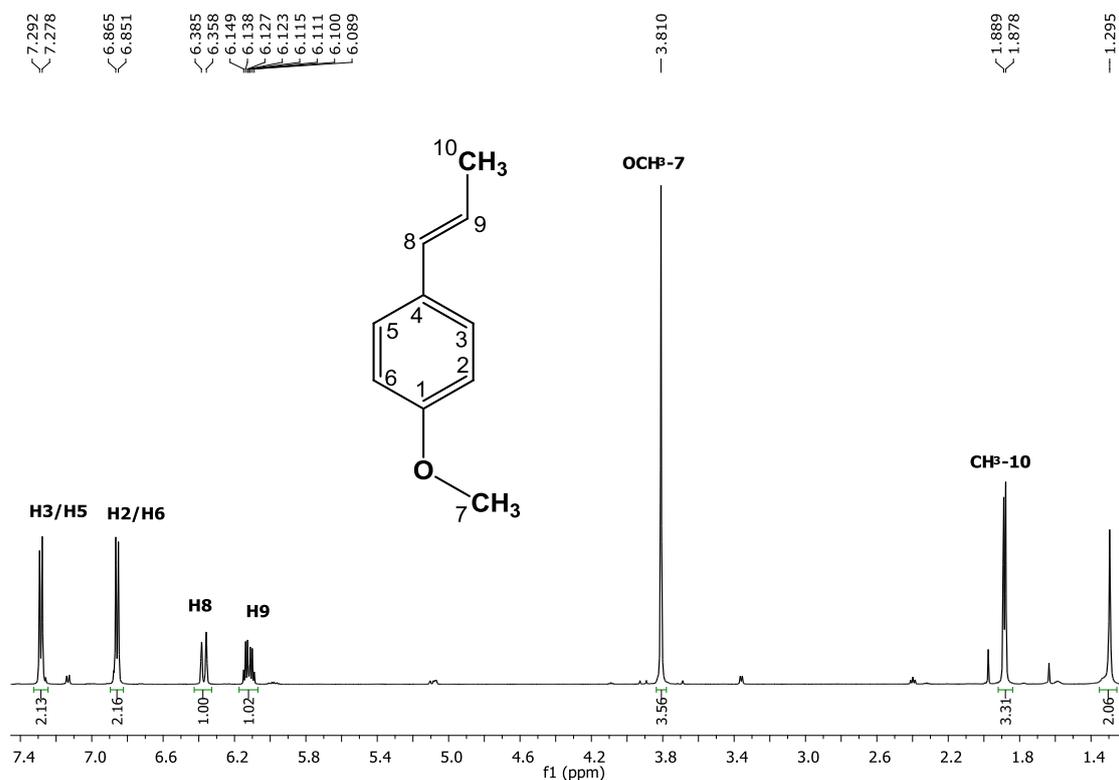


Figura 53. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 500 MHz) de *trans*-anetol.

Asignación de señales de carbono por RMN 2-D (correlaciones ^1H - ^{13}C)

En el espectro HSQC (RMN 2-D de ^1H - ^{13}C , CDCl_3) de *trans*-anetol (Figura 54), se observan las correlaciones protón-carbono (a un enlace), que permitieron la asignación

de los átomos de carbono de la molécula, a excepción de los carbonos cuaternarios C-1 y C-4

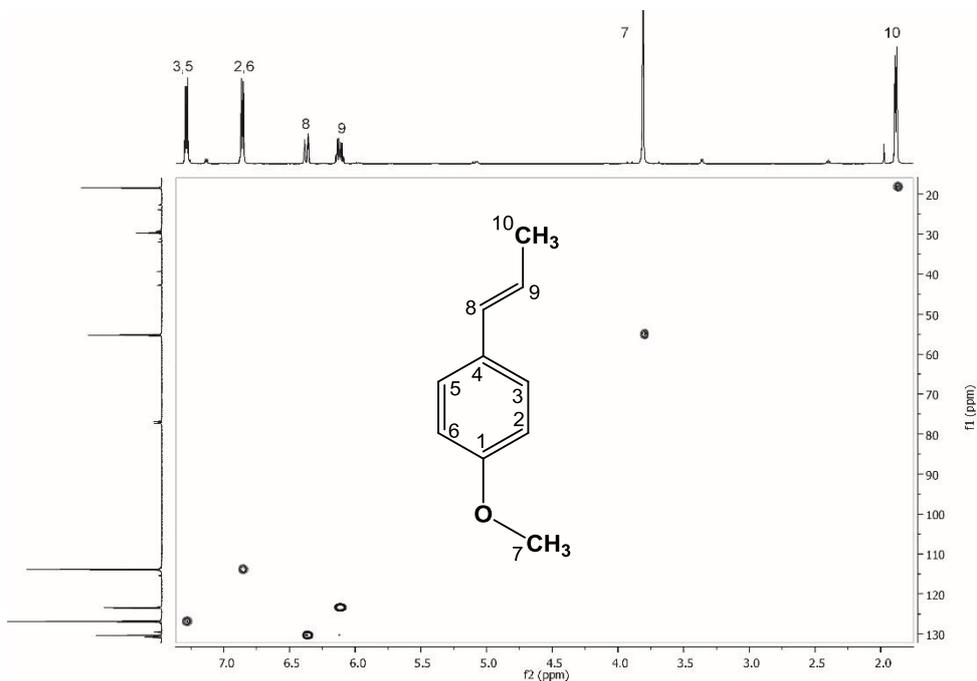


Figura 54. Espectro de RMN 2D ^1H - ^{13}C , HSQC (CDCl_3) de *trans*-anetol.

En el espectro de RMN ^{13}C , Figura 55, se muestra la asignación de todos los carbonos de la molécula. Hay que destacar que los carbonos C-1 y C-4, fueron asignados por modelización molecular con el **Programa ACD/Labs** y por comparación con los datos encontrados en la bibliografía química.

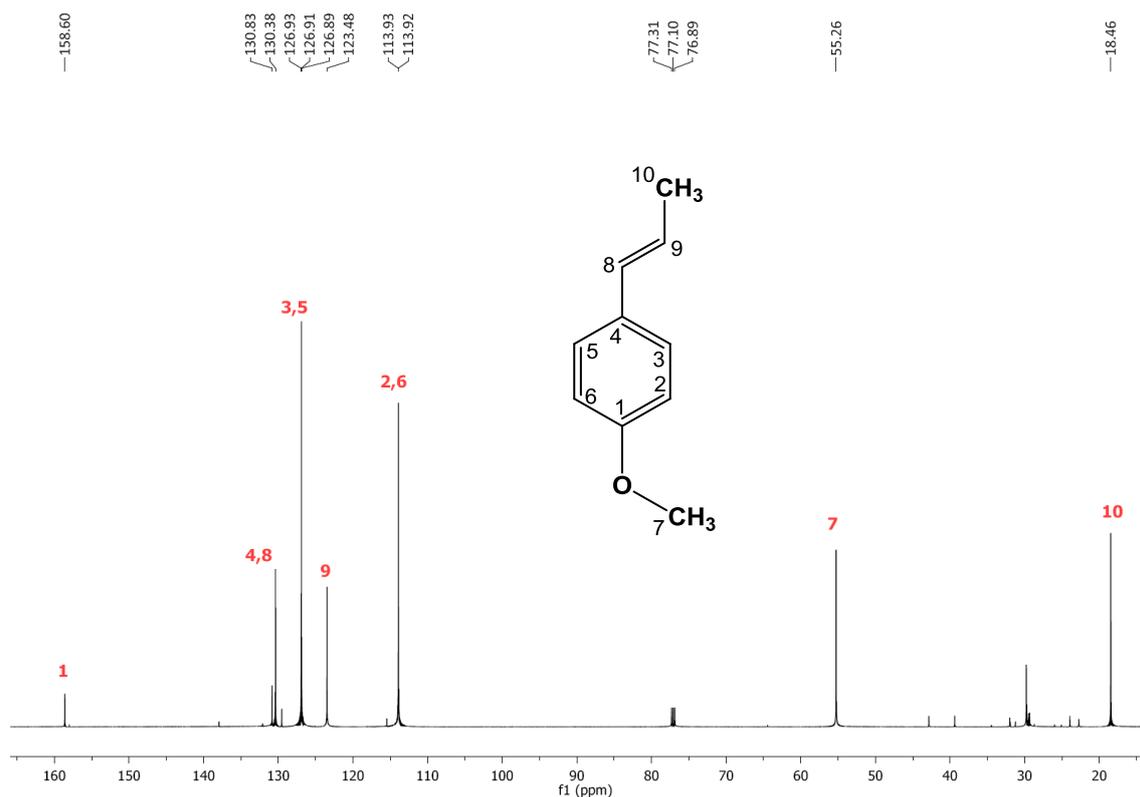


Figura 55. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 125 MHz) de *trans*-anetol

Datos espectroscópicos de RMN ^1H y ^{13}C para el compuesto *trans*-anetol.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.28 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-3, H-5); 6.86 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-2, H-6); 6.37 (1H, d, $J = 16.6$ Hz, H-8); 6.12 (1H, dq, $J = 15.6, 6.6$ Hz, H-9), 3.81 (3H, s, OCH_3); 1.88 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, CH_3), 1.30 (s, 2H, cera).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ : 158.6 (s, C-1); 130.8 (s, C-4); 130.4 (d, C-8); 126.9 (d, C-3; d, C-5); 123.5 (d, C-9); 113.9 (d, C-2; d, C-6); 55.3 (c, C-7); 18.5 (c, C-10).

Todos los datos, fueron cotejados con los datos encontrados en la bibliografía química (10), para la identificación del compuesto *trans*-anetol.

5.2 CUANTIFICACIÓN

En este apartado se describen los aspectos relacionados con la metodología de análisis por cromatografía de gases, utilizada para determinar el contenido de *trans*-anetol en las muestras de aceites esenciales.

5.2.1 Curva de calibración

La construcción de la curva de calibración se realizó preparando una solución de concentración 0.0536 mg *trans*-anetol /mg de solución madre de la siguiente forma:

Solución Madre

- Patrón de *trans*-anetol

$$0.0548 \text{ g} = \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} = 54.8 \text{ mg } \textit{trans} - \textit{anetol}$$

- Patrón de anisaldehído

$$0.002 \text{ g} = \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} = 2.0 \text{ mg anisaldehído}$$

Solvente *n*-hexano

$$0.9644 \text{ g} = \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} = 964.4 \text{ mg } \textit{n} - \textit{hexano}$$

Los miligramos de solución quedan constituidos de la siguiente forma:

$$58.8 \text{ mg } \textit{trans}\text{-anetol} + 2.0 \text{ mg anisaldehído} + 964.4 \text{ mg } \textit{n}\text{-hexano} = 1,021.2 \text{ mg sln madre.}$$

Siendo entonces la concentración de *trans*-anetol en la solución madre así:

$$C = \frac{54.8 \text{ mg } \textit{trans} - \textit{anetol}}{1,021.2 \text{ mg sln madre en } \textit{n} - \textit{hexano}}$$
$$= 0.0536 \text{ mg } \textit{trans} - \textit{anetol}/\text{mg sln madre}$$

A partir de la solución madre se preparó una disolución de concentración 1.18×10^{-3} mg/mg.

Solución Stock

De la solución madre 0.0450 g

Solvente 1.985 g *n*- hexano

Los gramos de solución quedan constituidos de la siguiente forma:

$$0.0450 \text{ g sln madre} + 1.985 \text{ g } \textit{n}\text{- hexano} = 2.030 \text{ g/g sln Stock}$$

Concentración de la sln Stock

$$C = 0.0450 \text{ g sln madre} \times \frac{0.0536 \text{ mg } \textit{t} - \textit{anetol} / \text{mg madre}}{2.030 \text{ g sln Stock}} = 1.18 \times 10^{-3} \text{ mg/mg}$$

A partir del cual se obtuvieron los patrones con los cuales se elaboró la curva de calibración; a continuación, se detallan los cálculos de concentración para cada uno de los puntos.

Puntos para la curva de calibración

Concentración #1

Partiendo de la sln Stock, se toma una alícuota de 0.1005 g y se disuelve en 0.9155 g de *n*-hexano.

Los gramos de solución para la concentración #1 quedan constituidos de la siguiente forma:

$$0.1005 \text{ g sln Stock} + 0.9155 \text{ g } n\text{-hexano} = 1.016 \text{ g concentración \#1}$$

Por lo tanto,

$$C = 0.1005 \text{ g sln Stock} \times \frac{1.18 \times 10^{-3} \text{ mg/mg}}{1.016 \text{ g concentración \#1}} = 1.17 \times 10^{-4} \text{ mg/mg}$$

Concentración #2

Partiendo de la sln Stock, se toma una alícuota de 0.2045 g y se disuelven en 0.8235 g *n*-hexano.

Los gramos de solución para la concentración #2 quedan constituidos de la siguiente forma:

$$0.2045 \text{ g sln Stock} + 0.8235 \text{ g } n\text{-hexano} = 1.028 \text{ g concentración \#2}$$

Por lo tanto,

$$C = 0.2045 \text{ g sln Stock} \times \frac{1.18 \times 10^{-3} \text{ mg/mg}}{1.0280 \text{ g concentración \#2}} = 2.34 \times 10^{-4} \text{ mg/mg}$$

Concentración #3

Partiendo de la sln Stock, se toma una alícuota de 0.3038 g y se disuelven en 0.7017 g *n*-hexano.

Los gramos de solución para la concentración #3 quedan constituidos de la siguiente forma:

$$0.3038 \text{ g sln Stock} + 0.7017 \text{ g } n\text{-hexano} = 1.0055 \text{ g concentración \#3}$$

Por lo tanto,

$$C = 0.3038 \text{ g sln Stock} \times \frac{1.18 \times 10^{-3} \text{ mg/mg}}{1.0055 \text{ g concentración \#3}} = 3.56 \times 10^{-4} \text{ mg/mg}$$

Concentración #4

Partiendo de la sln Stock, se toma una alícuota de 0.4100 g y se disuelven en 0.6400 g *n*-hexano.

Los gramos de solución para la concentración #4 quedan constituidos de la siguiente forma:

$$0.4100 \text{ g sln Stock} + 0.6400 \text{ g } n\text{-hexano} = 1.050 \text{ g Concentración \#4}$$

Por lo tanto,

$$C = 0.4100 \text{ g sln Stock} \times \frac{1.18 \times 10^{-3} \text{ mg/mg}}{1.0500 \text{ g concentración \#4}} = 4.61 \times 10^{-4} \text{ mg/mg}$$

En la tabla 2, se presentan los valores de concentración y las respectivas áreas bajo la curva para cada concentración obtenida en cromatografía de gases:

Tabla 2. Cuadro de medidas de concentración para la curva de calibración

Nivel	Concentración (mg/mg)	Área 1	Área 2	Área 3	Área Promedio
1	0.000117	7658	14625	12554	11612
2	0.000234	33341	29168	35056	32522
3	0.000356	53467	52617	61359	55814
4	0.000461	59805	105845	59128	74926

La curva de calibración obtenida (Figura 56) tiene un valor de coeficiente de determinación de 0.9998, aceptable para una línea de tendencia recta; la siguiente ecuación que se presenta en el gráfico es:

$$y = 2.0 \times 10^8 x - 10243$$

Ec 1.1

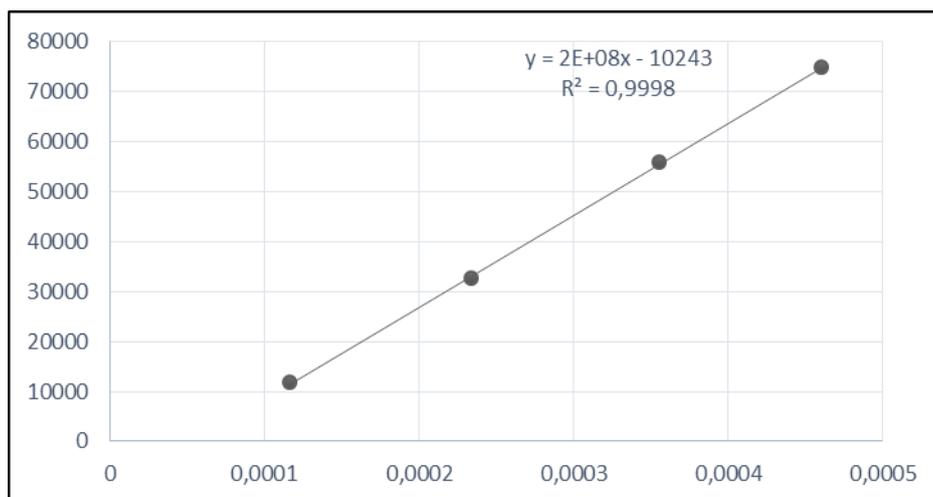


Figura 56. Curva de calibración Concentración vs Área, para la cuantificación de *trans*-anetol.

En la figura 57, se muestra el cromatograma correspondiente a un punto de la curva de calibración, en el cual se observan dos señales (picos) el de tiempo de retención (t_r) 6.52 minutos corresponde a Anisaldehído y el de t_r 6.79 minutos correspondiente a *trans*-anetol.

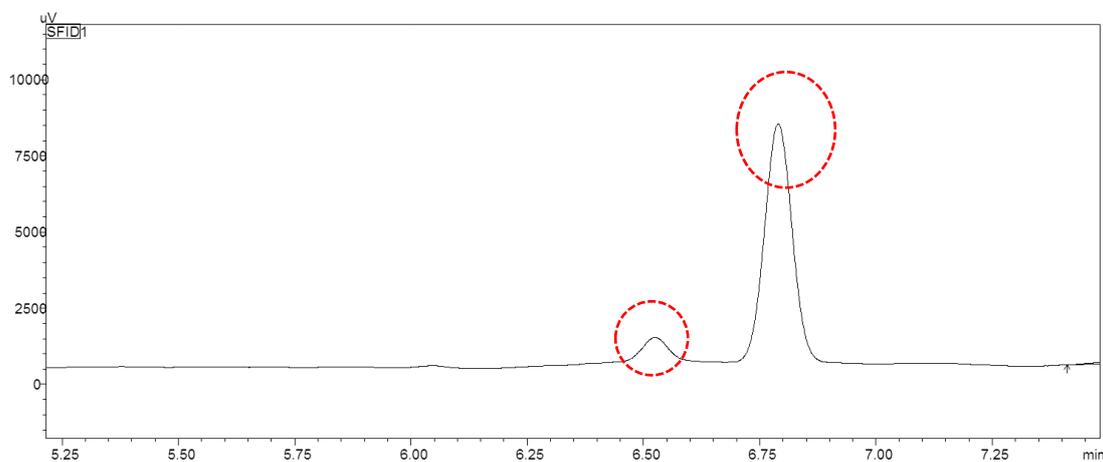


Figura 57. Tiempos de retención de los patrones anisaldehído 6.52 minutos y *trans*-anetol 6.79 minutos.

A continuación, se describe la metodología empleada para cuantificar el contenido de *trans*-anetol en las muestras de los aceites esenciales de:

- I) *Pimpinella anisum*
- II) *Illicium verum*
- III) *Foeniculum vulgare*
- IV) *Piper marginatum Jacq*
- V) *Tagetes filifolia Lag*

I- *Pimpinella anisum*

La cuantificación de *trans*-anetol en los extractos de cada una de las muestras se realizó de la siguiente manera:

A partir de la ecuación de la línea recta obtenida en la curva de calibración; Ec. 1.1

$$x = \frac{y + 10243}{2.0 \times 10^8}$$

$$x = \frac{50,922 + 10243}{2.0 \times 10^8}$$

$$x = 3.0583 \times 10^{-4}$$

En donde Y representa el área bajo la curva y en este caso le corresponde un valor de 50,922, respecto al cromatograma obtenido de una alícuota del extracto de *Pimpinella anisum* (1.0163 g extracto / g de solución); obteniendo así 0.7948 g *trans*-anetol/ g extracto.

En la figura 58 se resume el proceso de cuantificación de *trans*-anetol para el extracto de *Pimpinella anisum*.

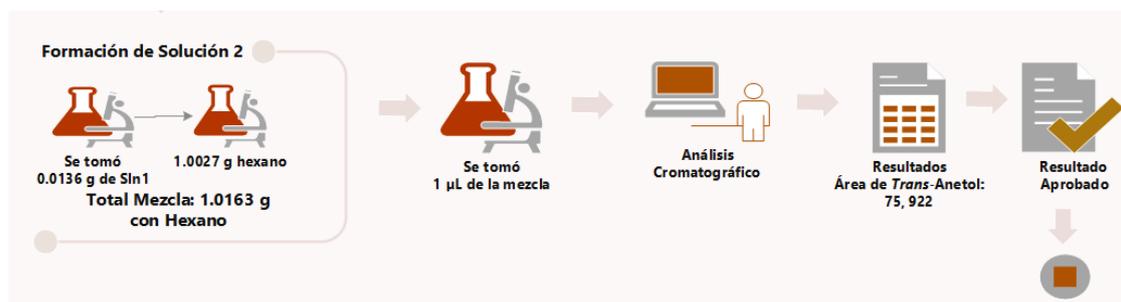


Figura 58. Esquema de la cuantificación de *trans*-anetol en *Pimpinella anisum*

El resultado anterior se multiplica por el peso total del extracto de *Pimpinella anisum*, obtenido a partir de 500 g de material vegetal.

$Trans\text{-anetol} = 0.7948 \text{ trans-anetol/g extracto} \times 4.8892 \text{ g extracto} = 3.8859 \text{ g trans-anetol}$ que corresponde a 79.4793 % de *trans*-anetol.

En la figura 59, se muestra el cromatograma correspondiente a una alícuota de extracto de *Pimpinella anisum*, en el cual se observan dos señales (picos) el de t_r 6.52 minutos corresponde a anisaldehído y el de t_r 6.79 minutos correspondiente a *trans*-anetol.

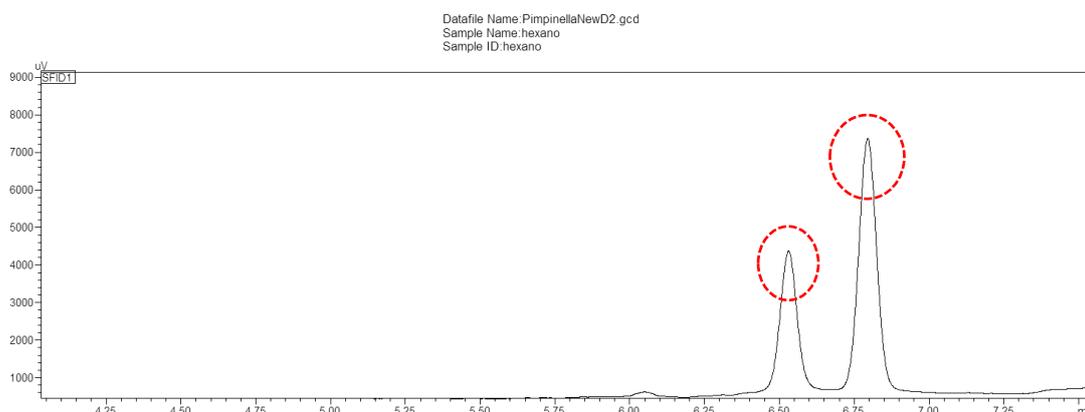


Figura 59. Tiempo de retención de anisaldehído 6.52 minutos y *trans*-anetol 6.79 minutos; para el extracto de *Pimpinella anisum*.

Los cálculos de cuantificación de *trans*-anetol se realizaron de la misma manera para todos los materiales vegetales.

II) *Illicium verum*

En la figura 60 se resume el proceso de cuantificación de *trans*-anetol para el extracto de *Illicium verum* y los resultados se recogen la tabla 3.

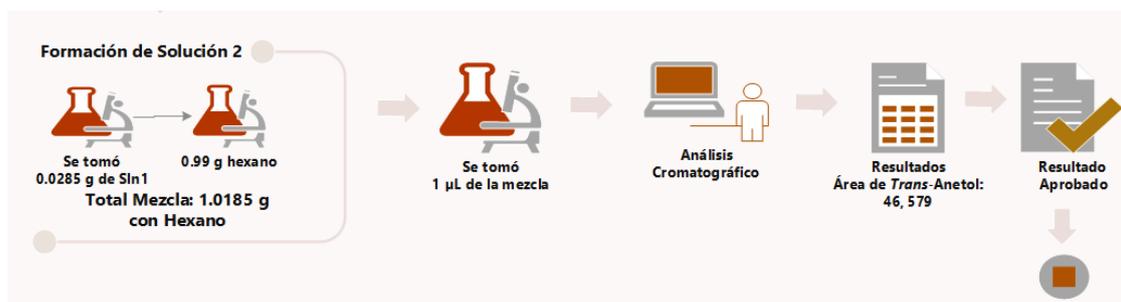


Figura 60. Esquema de la cuantificación de *trans*-anetol en *Illicium verum*

En la figura 61, se muestra el cromatograma correspondiente a una alícuota de extracto de *Illicium verum*, en el cual se observan dos señales (picos) una a t_r 6.52 minutos corresponde a anisaldehído y una a t_r 6.79 minutos correspondiente a *trans*-anetol.

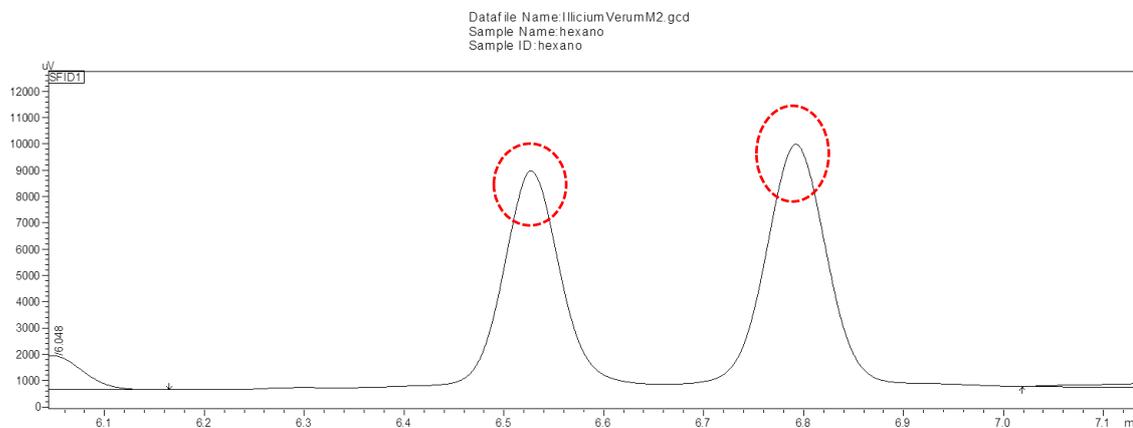


Figura 61. Tiempo de retención de anisaldehído 6.52 minutos y *trans*-anetol 6.79 minutos; para el extracto de *Illicium verum*.

III) *Foeniculum vulgare*

En la figura 62 se resume el proceso de cuantificación de *trans*-anetol para el extracto de *Foeniculum vulgare*; los resultados se recogen en la tabla 3.

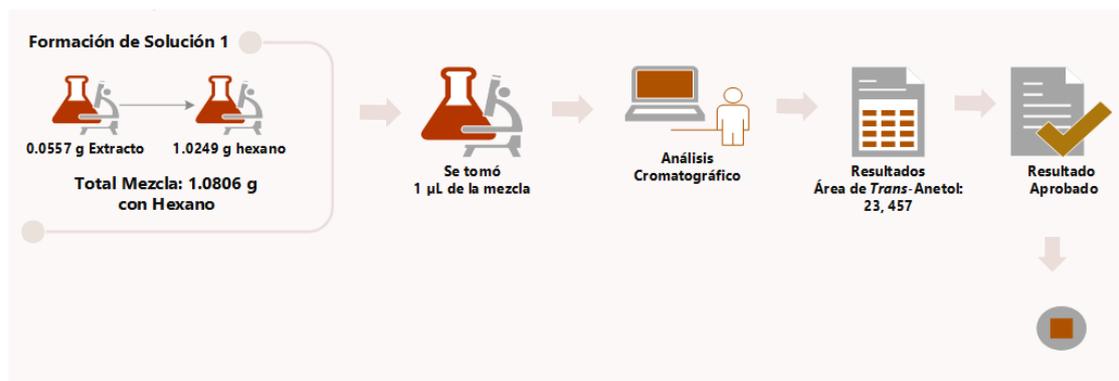


Figura 62. Esquema de la cuantificación de *trans*-anetol en *Foeniculum vulgare*

En la figura 63, se muestra el cromatograma correspondiente a una alícuota de extracto de *Foeniculum vulgare*, en el cual se observan dos señales (picos) una a t_r 6.52 minutos corresponde a anisaldehído y otra a t_r 6.79 minutos correspondiente a *trans*-anetol este último es evidente que su presencia es muy baja.

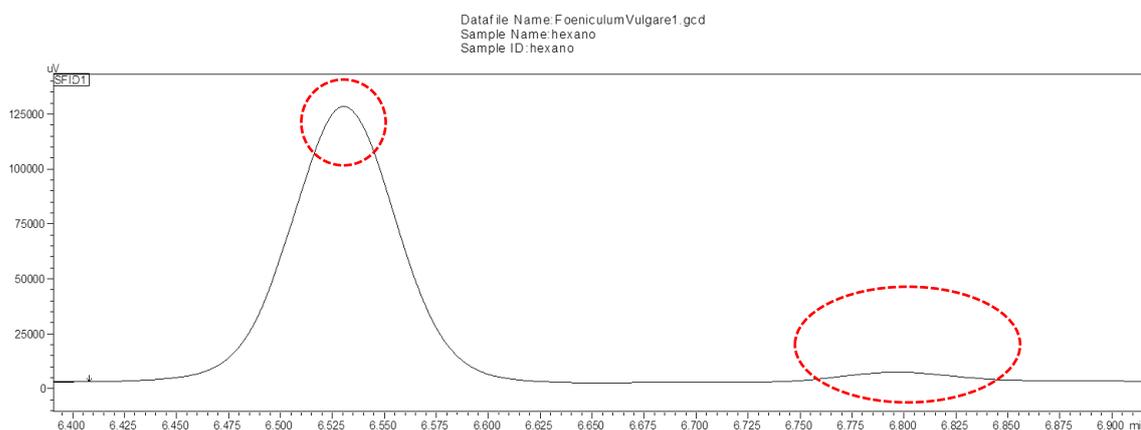


Figura 63. Tiempo de retención de anisaldehído 6.52 minutos y *trans*-anetol 6.79 minutos; para el extracto de *Foeniculum vulgare*.

IV) *Piper marginatum* Jacq

En la figura 64 se resume el proceso de cuantificación de *trans*-anetol para el extracto de *Piper marginatum* Jacq; los resultados se recogen en la tabla 3.

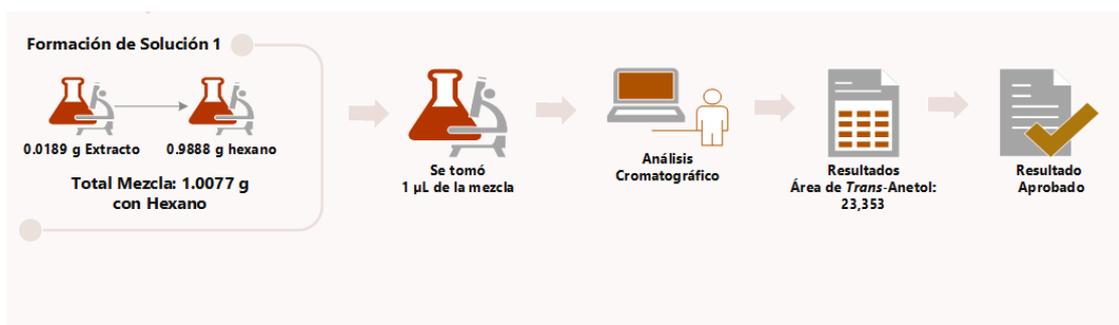


Figura 64. Esquema de la cuantificación de *trans*-anetol en *Piper marginatum* Jacq

En la figura 65, se muestra el cromatograma correspondiente a una alícuota de extracto de *Piper marginatum Jacq*, en el cual se observan dos señales (picos) muy bajas una a t_r 6.52 minutos corresponde a anisaldehído también y otra a t_r 6.79 minutos correspondiente a *trans*-anetol.

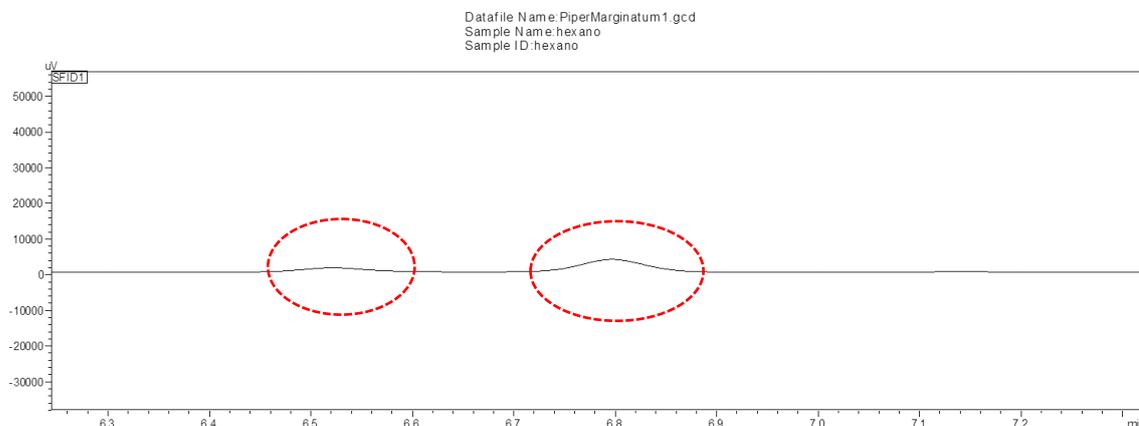


Figura 65. Tiempo de retención de anisaldehído 6.52 minutos y *trans*-anetol 6.79 minutos; del extracto de *Piper marginatum Jacq*.

V) *Tagetes filifolia Lag*

En la figura 66 se resume el proceso de cuantificación de *trans*-anetol para el extracto de *Tagetes filifolia Lag*; los resultados se recogen en la tabla 3.



Figura 66. Esquema de la cuantificación de *trans*-anetol en *Tagetes filifolia Lag*

En la figura 67, se muestra el cromatograma correspondiente a una alícuota de extracto de *Tagetes filifolia Lag*, en el cual se observan dos señales (picos) una a t_r 6.52 minutos corresponde a anisaldehído y otra a t_r 6.79 minutos correspondiente a *trans*-anetol; el primero se aprecia levemente.

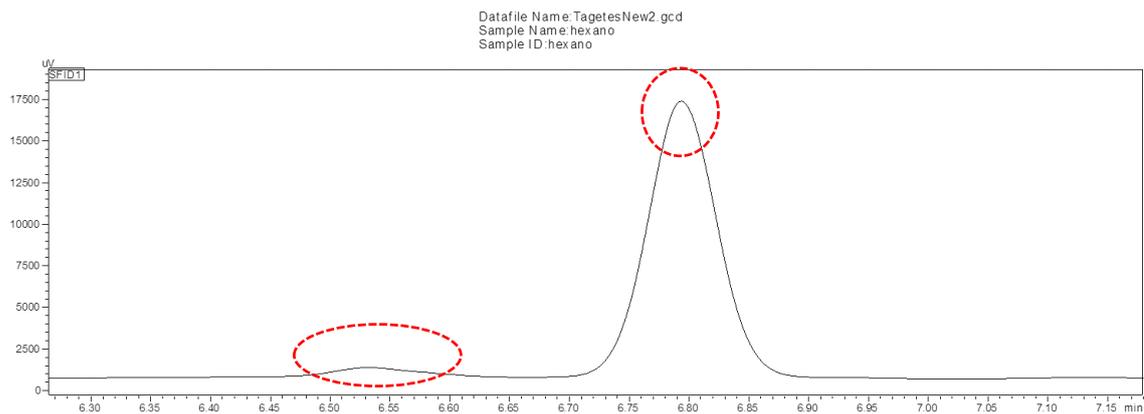


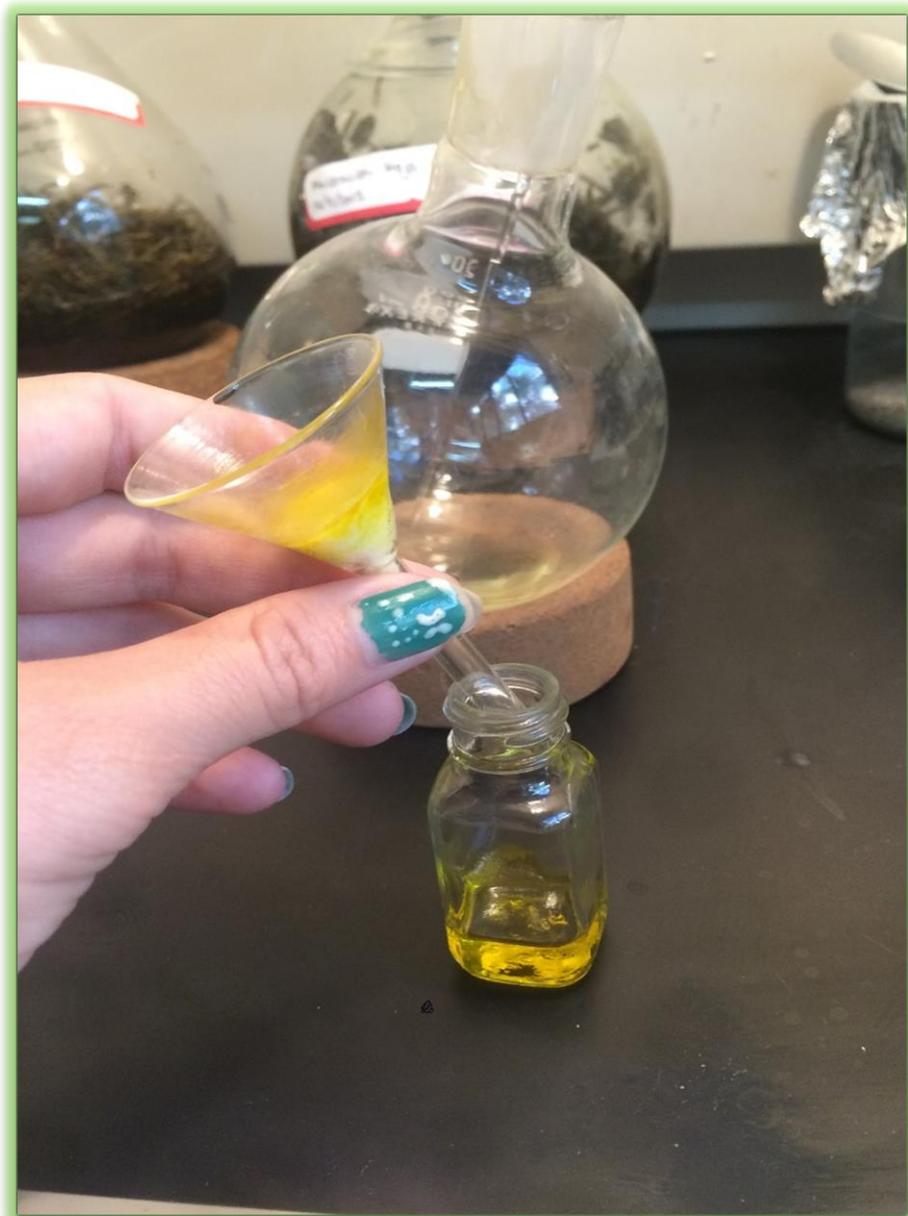
Figura 67. Tiempo de retención de anisaldehído 6.52 y *trans*-anetol 6.79; del extracto de *Tagetes filifolia* Lag.

En la tabla 3, se presentan las áreas bajo la curva obtenidas para cada alícuota de los extractos; según se detalla a continuación.

Tabla 3. Cuadro de áreas bajo la curva con sus respectivas concentraciones y porcentaje de *trans*-anetol.

Muestra	Å	g Material de partida	g Extracto	% Extracto	g <i>Trans</i> -anetol	% <i>Trans</i> -anetol
<i>Pimpinella anisum</i>	50,922	500 Semillas	4.8892	0.9778	3.8859	79.4793
<i>Illicium verum</i>	46,579	50 Semillas	3.9032	7.8064	1.2147	31.1206
<i>Foeniculum vulgare</i>	23,457	50 Semillas	1.201	2.402	0.0039633	0.33
<i>Piper marginatum</i> Jacq	21,353	31.2 Partes aéreas	1.3225	4.2388	0.011141	0.8424
<i>Tagetes filifolia</i> Lag	75,549	107.46 Partes aéreas	0.5260	0.4895	0.0980	18.6312

* Las áreas son promedios de tres lecturas para cada alícuota de los extractos. Como se aprecia en la tabla 5.2; la muestra con mayor presencia de *trans*-anetol son las semillas de *Pimpinella anisum* 79.4793% y en el caso de las partes aéreas se observa que es la planta de *Tagetes filifolia* Lag 18.6312% evidentemente mayor que *Piper marginatum* Jacq.



CAPITULO VI

CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. A partir de 500 g de semillas *Pimpinella anisum*, mediante destilación por corriente de vapor y extracción con disolventes orgánicos, se obtuvieron 4.89 g de extracto; de 50 g de semillas de *Illicium verum*, se obtuvieron 3.90 g de extracto; de 50 g de semillas de *Foeniculum vulgare*, se obtuvieron 1.20 g de extracto; así también, a partir de 31.2 g de las partes aéreas de *Piper marginatum Jacq* se obtuvieron 1.32 g de extracto y de 107.46 g de las partes aéreas de *Tagetes filifolia Lag*, se obtuvieron 0.53 g de extracto.
2. Se identificó mediante cromatografía en capa fina analítica, varios metabolitos secundarios en cada uno de los extractos; de los cuales dos compuestos presentaron el mismo Rf, correspondiendo entonces a metabolitos comunes en las cinco plantas anisadas.
3. Los cinco extractos fueron analizados por Cromatografía de Gases, luego por comparación de tiempos de retención con patrones puros, se identificaron dos metabolitos, *trans*-anetol y anisaldehído.
4. Mediante cromatografía en capa fina preparativa, se aislaron los dos metabolitos Identificados, los que corresponden a *trans*-anetol y anisaldehído.
5. Por métodos de RMN ¹H, mono y bidimensional (COSY); RMN ¹³C bidimensional heteronuclear (HSQC); así como espectroscopia de IR, se identificó y se determinó la estructura del metabolito, *trans*-anetol, de acuerdo a los objetivos de este trabajo. La determinación estructural se describe en el apartado de resultados y discusión de resultados.
6. Por cromatografía de gases, se cuantificó *trans*-anetol en cada uno de los extractos. La cuantificación esta expresada en porcentaje en peso de *trans*-anetol:
 - a. *Pimpinella anisum* 79.48%
 - b. *Illicium verum* 31.12%
 - c. *Foeniculum vulgare* 0.33%
 - d. *Piper marginatum Jacq* 0.84%

e. *Tagetes filifolia* Lag 18.63%

7. Se identificó y cuantificó *trans*-anetol en los extractos de las partes aéreas de *Piper marginatum* Jacq y *Tagetes filifolia* Lag, este es el primer estudio fitoquímico de estas dos plantas en El Salvador.
8. El bajo contenido de *trans*-anetol en *Piper marginatum* Jacq, determinado en este trabajo, puede ser debido a la época del año en la que se colectó así, como la zona geográfica de tal recolección; también porque el aceite esencial está compuesto de otros metabolitos en donde el *trans*-anetol es minoritario.
9. La planta *Tagetes filifolia* Lag, presentó el 18.6% de *trans*-anetol, que es una medida relativamente alta de *trans*-anetol, si se compara con las otras dos especies con alto rendimiento en este trabajo. Los rendimientos obtenidos, serían la base para que se valore esta especie como fuente para la producción industrial de aceite esencial anisado y *trans*-anetol.



CAPITULO VII

RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

Una vez concluido el trabajo de investigación, se recomienda lo siguiente.

1. Promover estudios económicos que analicen la factibilidad de procesamientos industriales para los aceites esenciales extraídos de plantas anisadas.
2. Debe darse continuación a este proyecto de investigación ya que es el primero a nivel Nacional que incluye cinco plantas anisadas que contienen *trans*-anetol.
3. Con la planta *Piper marginatum Jacq* se sugiere realizar trabajos de investigación fitoquímica de la especie a partir de muestras recolectadas en distintas zonas de El Salvador.
4. Ejecutar pruebas de rendimiento de aceite esencial en la planta *Tagetes filifolia Lag* y estudiar los rendimientos en plantas de distintas zonas geográficas.
5. De ser posible realizar un estudio para la cuantificación de Anisaldehído y otros metabolitos en este tipo de plantas ya que los análisis por Cromatografía de Gases mostraron la existencia varios compuestos.



CAPITULO VIII

REFERENCIAS

8.0 REFERENCIAS

1. De feo, V.; Della Porta, G.; Urrunaga, Soria, E.; Urrugana, Soria, R.; Senatore, F. *Flavour and fragrance Journal*, **1998**, 13, 145-147.
2. Caballero-Gallardo, K.; Olivero-Verberl, J.; Pino-Benitez, N.; Stashenko, E. E. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*, **2014**, 13, 10-19.
3. Harborne, J. B. Recent advances in chemical ecology. *Natural Products Reports*, **1989**, 6, 85-108.
4. Martínez MA. Aceites esenciales. 1era Ed. Medellín. Universidad de Antioquia; **2003**.
5. Santos Carrillo MA. Evaluación del rendimiento de aceite esencial de Hinojo (*Foeniculum vulgare*) procedente de dos niveles altitudinales de Guatemala. [Ingeniería]. Guatemala. Universidad San Carlos de Guatemala. **2006**.
6. Velásquez J. Proyecto piloto “Recolección, adaptación y producción de biomasa de plantas medicinales y aromáticas de la Sierra Ecuatoriana”. Quito. **1996**.
7. Hiscox GD, Hopkins A. Enciclopedia práctica de recetas industriales y formulas domésticas. Ediciones Gili. México. **1988**.
8. Cuaspuud M. Extracción de aceites esenciales y análisis de posibles compuestos insecticidas de Vetiver (*Vetiveria Zinazoide*), en La Carolina Provincia de Imbabura. [Ingeniería].Universidad Técnica del Norte. **2004**.
9. Márquez LA. Extracción de aceites esenciales de Mandarina (*Citrus reticulata*) utilizando Dióxido de Carbono en condición supercrítica como solvente. [Ingeniería]. Caracas. Universidad Central de Venezuela. **2003**.
10. Sicker, D. and Berger, S. *Classics in Spectroscopy. Isolation and Structure Elucidation of Natural Products*. **2009**, First Ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA Weinheim, Germany.
11. Aggarwal, BB.; Shishodia, S. “Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer” *Biochem. Pharmacol.* **2006**; 17, 1397-1421.
12. Attokaran M. *Natural Food Flavors and Colorants*. **2011**, First Ed. Wiley-Blackwll and IFT Press. Iowa.

13. Clark, GS. "An aroma chemical profile; anethole". *Perfumer & flavorist*. **1993**; 18, 11-12, 14-18.
14. ITEIPMAI. "*Aneth, Anethum graveolens L. (Peucedanum graveolens Benth.)* Umbelliferae; Apiaceae. Reproduccion interdite. **1992**; 5, 92.
15. Curioni A, Arizio Osvaldo. Plantas aromáticas y medicinales umbelífera "Coriandro, anís, comino, eneldo y Alcaravea". Cultivo, economía y mercado. 1^{era} ed. **1997**. Buenos Aires. Hemisferio Sur S. A
16. Quiñonez Gutiérrez V. Análisis de los principios activos de las especies Mexicanas de anís y evaluación de su utilidad biológica sobre microorganismos patógenos. [Doctorado]. Nuevo León. Universidad Autónoma de Nuevo León. **2012**.
17. Huang Zonzliang. Anethole Development Trends. Chengdu Jianzhong. Flavours & Fragrances. Sichuan Province, China. **2012**; 1, 103-111.
18. F. Bakkali et al. *Food and Chemical Toxicology*. **2008**, 46, 446-475.
19. Sanchez Y. y Correa TM: Caracterizacion química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Piper marginatum* Jacq. *Protección vegetal*. **2011**; 26, 170-176.
20. Hussain R.; Poveda L.; Pezzuto J. Sweetening agents of plant origin: Phenilpropanoid constituents of seven Sweet-tasting plants. *Eco Bot*. **1990**; 44, 174-182.
21. Cano Morales T.; Chávez B.; Gódinez J. Obtención y caracterización del aceite esencial y oleoresina de la pimienta negra (*Piper nigrum L.*) cultivada en Guatemala, una alternativa de desarrollo agroindustrial para el agricultor Guatemalteco. Guatemala. Universidad San Carlos Guatemala. **2002**.
22. Furnari G.; Gluglielmo A.; Lunghitano N. *Tabla botánica sistemática*. **2003**. Cataluña. Universidad de Catania.
23. Saralegui H. Piperaceae. En: Jreuter W& Rankin R, editors. *Flora de la República de Cuba. Serie A, Plantas vasculares. Fascículo Koenigstein: Koeltz Scientific Books*; **2004**; 94.
24. Restrepo M.; Romero P.; Fraumé J. *Manual el milagro de las plantas aplicaciones medicinales y orofaríngeas; colección cuidando la creación*. **2005**. Editorial San Pablo. Bogotá.

25. Revista de medicina tradicional mexicana de la Universidad Autónoma Mexicana **2014**.
26. Bohrmann, H. and Youngkrn, W. *Esdragole, the main compound in the volatile oil of Tagetes filifolia Lag (compositae)*. *Phytochemistry*. **1968**, 7, 1415-1417.
27. Della Porta G. y Urrugana Soria E. Composition of the essential oil of *Tagetes filifolia* Lag. *Flavour and fragrance Journal*. **1998**; 13, 145-147.
28. Vila RJ.; Iglesias.; Ciccio JF. Essential oil of *Tagetes filifolia* from Costa Rica. *Ciencia Química*. **2000**; 1, 13-14.
29. Zygaldó J.; Lamarque D.; Maestri DM. Composition of the inflorescence oils some *Tagetes* species from Argentina. *J. Essential oil Res.* **1993**; 5 (6), 679-682.
30. Rea Martínez J. Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico y subextractos etéreo y cloroformico de (*Drymaria avata*), (*Senna macrophylla*) y (*Tagetes filifolia* Lag).[Licenciatura]. Riobamba. Escuela Superior politécnica de Chimborazo. **2012**.
31. Serrato M. y Barajas J. Poblaciones silvestres de *Tagetes filifolia* Lag. En el centro sur de México. *Revista fitotecnia Mexicana* Nº2. México D.F. **2006**; 29, 7-12.
32. Rodríguez Yunta M. y Gómez Contreras F. Curso experimental en Química Orgánica. 1^{era} Edición. Madrid. Editorial Síntesis; S.A.
33. Martínez Graw M. y Csáky A. Técnicas experimentales en síntesis orgánica. Primera reimpression. **2001**. Madrid. Editorial Síntesis, S.A.
34. Del Cid Amaya JW. Características químicas y nutricionales del aceite de semilla de morro (presencia atala H. B. K). Obtenido por prensa [Maestría] Guatemala. Universidad San Carlos de Guatemala. **1980**.
35. James A.T and Martín A.J.P. Gas liquid partition chromatography. *Biochem.* **1952**.
36. Kitson Fulton G.; Larsen BS.; McEwen CN. *Gas Chromatography and Mass Spectrometry. A Practical Guide*. **1996**. Academic Press. USA.
37. Rubinson K. *Análisis instrumental*. Primera edición. **2001**. Madrid. Pearson educación S.A.
38. Roussac F. *Métodos y técnicas instrumentales modernas, análisis químico*. 5^{ta} edición. **2003**. Paris. Mc Graw-Hill/Interamericana de España.

39. Pavia, DL.; Lampan GM.; Kriz GS. Introduction to Spectroscopy. **2001**. 3^{era} Ed. Western Washington University. Washington.
40. Egan, H.; Kirk, R. S.; Sawyer, R. *Análisis Químico de Alimentos de Pearson*. Segunda impresión, **1987**, Compañía Editorial Continental S. A. México
41. Rosemary C. and William F. Using NMR to identify and characterize natural products. *Journal of the society of chemistry*. **2013**; 30, 501-504
42. Skoog A.D, Holler F.J y Nieman TA. *Principios de Análisis Instrumental*. 5^{ta} Ed. **1992**, Madrid. McGraw-Hill/ Interamericana de España, S. A. U.
43. McLafferty, FW.; Toreček, F. *Interpretation of mass spectra*. **1993**. 4^{ta} Ed. University Science Books. California.

ANEXOS

Asociación Jardín Botánico La Laguna



Antiguo Cuscatlán, 12 de Abril de 2016.

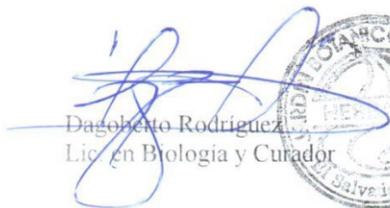
A quien interese.

Por medio de la presente nota, hago del conocimiento que la Srta. bachiller **Luz Marina Ramírez Ramos** con carnet RR09151, estudiante de la carrera de Licenciatura en Ciencias Químicas de La Universidad de El Salvador, se hizo presente al Herbario LAGU de nuestra institución este día, con una muestra botánica seca para el análisis y clasificación sistemática, la cual se sometió a revisión de literatura y comparación con imágenes de especies tipo para poder clasificarle, resultando ser: *Piper marginatum* Jacq. la cual pertenece a la familia (PIPERACEAE).

Con el resultado anterior la estudiante manifiesta que la especie será utilizada con fines de elaboración de tesis de grado denominada: "Cuantificación de Trans-Anetol de Aceites esenciales extraídos de cinco plantas anisadas"

Por tanto, se extiende la siguiente nota, para que la interesada haga buen uso y para lo que estime conveniente dentro del trabajo de grado.

Atte.


Dagoberto Rodríguez
Lic. en Biología y Curador





Asociación Jardín Botánico La Laguna

Antiguo Cuscatlán, 27 de enero de 2016

A quien interese.

Por medio de la presente nota, hago del conocimiento que la srita. bachiller **Luz Marina Ramírez Ramos** con carnet RR09151, estudiante de la carrera de Licenciatura en Ciencias Químicas de La Universidad de El Salvador, se hizo presente al Herbario LAGU de nuestra institución este día, con una muestra botánica seca para el análisis y clasificación sistemática, la cual se sometió a revisión de literatura y comparación con imágenes de especies tipo para poder clasificarle, resultando ser: *Tagetes filifolia* Lag., y que pertenece a la familia (ASTERACEAE).

Con el resultado anterior la estudiante manifiesta que la especie será utilizada con fines de elaboración de tesis de grado denominada: "Cuantificación de Trans-Anetol de Aceites esenciales extraídos de cinco plantas anisadas"

Se extiende la siguiente nota, para que la interesada haga buen uso, y para lo que estime conveniente dentro del trabajo de grado.

Atte.


Dagoberto Rodríguez
Lic. en Biología y Curador



Urbanización Industrial Plan de La Laguna, Antiguo Cuscatlán La Libertad, Tel.(503) 2243 – 7970 / 2243 – 7968
Email: jardinbotanico@jardinbotanico.org.sv Sitio Web: www.jardinbotanico.org.sv

ANEXO 2

Actividades año 2016	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre
Analisis cromatografico	■	■						■				
Analisis espectroscopico			■	■	■	■		■				
Elaboración de la curva de calibracion por GC					■	■	■	■				
Analisis por Cromatografía de Gases						■	■	■	■	■		
Cuantificacion de <i>trans-anetol</i>								■	■	■	■	■
Elucidacion estructural								■		■	■	■

Actividades año 2017	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre
Reestructuración del marco teórico	■	■	■									
Revisión del diseño metodológico realizado			■	■								
Revisión de análisis de resultados					■	■						
Última revisión y evaluación del desarrollo del proyecto						■	■					
Elaboración de conclusiones							■					
Elaboración de las recomendaciones							■					
Entrega del documento								■				
Defensa con Final.									■			
Observaciones y correcciones Finales									■			
Entrega de ejemplares en Administración Académica de la Facultad									■			