





REVISTA

94

PU
CE

3 DE MAYO-3 DE NOVIEMBRE DE 2012
QUITO-ECUADOR
ISSN 1013-89X

PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DEL ECUADOR

ESCUELA DE QUÍMICA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

Centro de Publicaciones

Escuela de Química

Revista PUCE

Quito-Ecuador

Rector

Dr. Manuel Corrales Pascual, S.J. (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito-Ecuador)

Vicerrector

Ing. Pablo Iturralde Ponce (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito-Ecuador)

Director General Académico

Dr. Carlos Acurio Velasco (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito-Ecuador)

Director del Centro de Publicaciones

Magíster Jesús Aguinaga Zumárraga (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito-Ecuador)

Directora Escuela de Ciencias Químicas

Dra. Lorena Meneses O. Ph.D.

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Miembros del Comité Ejecutivo del Centro de Publicaciones (Comité Editorial):

Presidente (Editor en Jefe)

Magíster Jesús Aguinaga Zumárraga (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito-Ecuador)

Vocales (Comité Editorial):

Dr. Hugo Reinoso Luna (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito-Ecuador)

Dr. Luis María Gavilanes Del Castillo (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito-Ecuador)

Secretario (Coordinador del Comité Editorial)

Lcdo. Walter Jiménez Sarabia (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito-Ecuador)

Miembros del Comité Editorial de la Escuela de Ciencias Químicas

Dra. Lorena Meneses (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito-Ecuador)

Mtr. Fernanda Pilaquinga (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito-Ecuador)

Mtr. Pablo Pozo (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito-Ecuador)



Secretaría

Fátima Tasiguano Morales (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito-Ecuador)

Autores

Cristina Mena (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito-Ecuador)
Fernanda Pilaquinga (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito-Ecuador)
Lorena Meneses (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito-Ecuador)
Pamela Carrillo (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito-Ecuador)
David Romero (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito-Ecuador)
Wendy Heredia (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito-Ecuador)
Alejandra Hidalgo (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito-Ecuador)
Alexandra Hidalgo (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito-Ecuador)
Yolanda Jibaja (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito-Ecuador)
Marco Dehesa (Universidad Politécnica Salesiana, Quito-Ecuador)
Migdalia Miranda (Universidad de La Habana-Cuba)
Fernanda Montaña (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito-Ecuador)
Pablo Pozo (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito-Ecuador)
Pablo López (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito-Ecuador)
Andrea Guzmán (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito-Ecuador)

Corrector de estilo y ortografía

Alfonso Sánchez (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito-Ecuador)

Colección n.º 94

3 de mayo de 2012

Publicación Semestral

ISSN. n.º 1013-89X

Registro de Derecho Autoral n.º 010645

La Revista de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador es una publicación semestral (mayo y noviembre) de su Centro de Publicaciones, que difunde trabajos académicos y científicos, estrictamente originales en español, en la áreas de Leyes, Pedagogía, Ingeniería, Economía, Biología, Química, Historia, Geografía, Antropología, Sociología, Filosofía, Teología, Comunicación, Lingüística, Literatura, Medicina, Administración, Arquitectura, Gestión Social, Psicología y Diseño, y es arbitrada por especialistas de indiscutible valor, cuyos nombres se mantienen en absoluta confidencialidad, recibe trabajos todo el año; el propósito de la Revista PUCE es difundir conocimientos, intercambiar experiencias e incentivar la producción del pensamiento especializado. El contenido de esta revista está dirigido a docentes, investigadores, estudiantes universitarios y público en general.

Los artículos son de responsabilidad exclusiva de sus autores

Los derechos de autor son exclusivos de la PUCE

Se prohíbe la reimpresión parcial o total con cualquier finalidad

Editorial: (Punto de Venta)
Centro de Publicaciones PUCE
Av. 12 de Octubre y Robles
Apartado n.º 17-01-2184
Telf.: 593-02-2991700
2991 700 (TRONCAL). Extensiones: 1013, 1014, 1711, 1122
Telf.: 593-02-2991711 (directo)
(se aceptan canjes)
jesus_aguinaga@hotmail.es
Quito-Ecuador.

Impresión:

PPL Impresores
Estados Unidos N16-56
593-02-2529762
pplimpresores@gmail.com
Quito-Ecuador



EDITORIAL

La Pontificia Universidad Católica del Ecuador, a través de su Centro de Publicaciones, ha editado su colección "Revista Académica de la PUCE" con un total de 93 números, que de manera ininterrumpida se han publicado a partir de febrero del año 1972 hasta la presente fecha. Se ha llegado con esta revista al número 94.

Esta gestión ha sido apoyada por nuestro Rector Dr. Manuel Corrales Pascual, S.J., ilustre maestro y directivo universitario y ser humano excepcional; por la Dra. Lorena Menezes Olmedo, Directora de la Escuela de Química en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la PUCE, como su personal docente y administrativo; por los miembros del Comité de Publicaciones: Dr. Hugo Reinoso Luna, Presidente del Consejo Superior de la PUCE; y Dr. Luis María Gavilanes del Castillo; y el personal del Centro de Publicaciones.

El Contenido científico de esta revista, contempla los siguientes temas: Aislamiento y caracterización del aceite esencial de albahaca, *Ocimum basilicum* L.; Caracterización del mecanismo de la reacción entre n-Hexeno y metanal a través de los conceptos de fuerza de reacción, constante de fuerza y flujo electrónico de reacción; De-

sarrollo y validación de un método para la determinación de hidrocarburos totales de petróleo (TPH's) mediante espectrofotometría de infrarrojos con transformadas de Fourier, en suelos fortificados; Determinación, cuantificación y comparación de la concentración de vitamina C en naranja (*Citrus aurantium*), limón (*Citrus aurantifolia*) y mandarina (*Citrus reticulata*) por HPLC; Formulación de un fitofármaco a partir de las hojas de *Ocotea quixos* (LAM.) (Kosterm. Ishpingo); Desarrollo y validación de un método de análisis para compuestos fenólicos en aguas superficiales, residuales y de consumo, por cromatografía líquida de alta eficiencia; Estudio comparativo de la estructura química del Anetol extraído del anís estrellado (*Illicium verum*) con el producto sintético y computacional; Perfil lipídico y contenido de ácidos grasos trans en productos ecuatorianos de mayor consumo.

Los presentes contenidos son una evidencia clara y objetiva del incuestionable valor científico puesto a consideración del mundo académico y del mundo global del conocimiento por parte de la Escuela de Química de la PUCE.

A propósito de los aportes señalados y escritos con profundidad y

que son también de actualidad, ellos, dejan una gran inyección para nuevas investigaciones científicas en esta área tan importante del conocimiento como es la Química, habida cuenta que del estudio de ella, depende el desarrollo de los campos de la industria, la farmacéutica, la biología, la agricultura, el ambiente, etc.

Expresamos nuestro reconocimiento a los autores que han colaborado con estos artículos, a la Escuela de Química y la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, que permanentemente contribuyen en beneficio de la Ciencia.

A nuestros colaboradores, amigos y colegas responsables de la Red de Editoriales Universitarias, de la Asociación de Universidades Jesuitas de América Latina (AUSJAL), de EULAC y de REUPDE, lectores permanentes y lectores en general, nuestra gratitud por sus comentarios y opiniones elevadas en relación con esta revista y por encender permanentemente y de distintas formas nuestro ánimo e interés para continuar adelante, cada vez con mayor entusiasmo.

Jesús Aguinaga Zumárraga
Director



PRESENTACIÓN

Química (del árabe kême, que significa tierra) es la ciencia que estudia tanto la composición, estructura y propiedades de la materia, como los cambios que esta experimenta durante las reacciones químicas y su relación con la energía.

La química es una ciencia básica, debido a su ubicuidad en las ciencias naturales. La química es de gran importancia en muchos campos del conocimiento como la medicina, la biología, la ingeniería, la astronomía, etc. Desde todo punto de vista, el universo está formado de sustancias químicas y todos los procesos que en él se llevan a cabo son producto de reacciones químicas. Todo lo que nos rodea es química: nuestra respiración, lo que nos alimenta, lo que nos abriga, el material del cual está fabricada esta publicación.

El estudio de la química es de tal importancia en el desarrollo de la humanidad, que creemos es nuestro deber como docentes de la PUCE, y

de manera específica de la Escuela de Ciencias Químicas, brindar un aporte a la actividad científica, docente y profesional, a través de la difusión de los resultados de trabajos de investigación realizados con esmero y dedicación, basados en el método científico en las distintas ramas de la química, como son la química de alimentos, la bioquímica, la fitoquímica, la química ambiental, la química analítica y la química computacional.

En nombre de la Escuela de Ciencias Químicas, deseo dejar constancia de mi agradecimiento a las autoridades de la PUCE por su apoyo decidido para continuar con la publicación de la Revista Académica PUCE; a los docentes colaboradores de esta obra, sin cuyo invaluable apoyo sería difícil continuar y de manera especial al equipo editorial de la revista. Deseamos que este aporte sea una oportunidad para fomentar la investigación, la producción científica y el desarrollo de la química en nuestro país.

Dra. Lorena Meneses Olmedo
Directora de la Escuela de Ciencias Químicas



CONTENIDO

Revista PUCE, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, ISSN 1013-89X
Número 94, 3 de mayo - 3 de noviembre de 2012

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE ALBAHACA, *Ocimum basilicum L.*

1

Cristina Mena P.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION

OF BASIL'S ESSENTIAL OIL, *Ocimum basilicum L.* 1

RESUMEN 3

INTRODUCCIÓN 5

I. MATERIALES Y MÉTODOS 6

II. RESULTADOS 8

III. DISCUSIÓN 11

IV. CONCLUSIONES 12

LITERATURA CITADA 14

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS PARA COMPUESTOS FENÓLICOS EN AGUAS SUPERFICIALES, RESIDUALES Y DE CONSUMO, POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA

17

Ana Alejandra Hidalgo A. • Alexandra P. Hidalgo J.

**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN ANALYTICAL METHOD FOR PHENOLIC
COMPOUNDS IN SURFACE WATER, WASTEWATER AND DRINKING WATER BY HIGH
PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY**

17

RESUMEN 19

INTRODUCCIÓN 22

I. MATERIALES Y MÉTODOS 24

II. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
III. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	32
LITERATURA CITADA	34
TABLAS	35
FIGURAS	39

CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE LA REACCIÓN ENTRE N-HEXENO Y METANAL A TRAVÉS DE LOS CONCEPTOS DE FUERZA DE REACCIÓN, CONSTANTE DE FUERZA Y FLUJO ELECTRÓNICO DE REACCIÓN	43
---	-----------

Pamela Carrillo S. • Lorena Meneses O.

MECHANISM CHARACTERIZATION OF THE REACTION BETWEEN N-HEXENE AND METHANAL THROUGH REACTION FORCE, REACTION FORCE CONSTANT AND REACTION ELECTRONIC FLUX CONCEPTS	43
RESUMEN	45
INTRODUCCIÓN	46
I. OBJETIVOS	48
II. MARCO TEÓRICO	48
III. MÉTODOS Y DETALLES COMPUTACIONALES	50
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
V. CONCLUSIÓN	55
LITERATURA CITADA	57

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO (TPH'S) MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA DE INFRARROJOS CON TRANSFORMADAS DE FOURIER,	
---	--



EN SUELOS FORTIFICADOS 59

David Romero E. • Wendy Heredia R.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A METHOD FOR THE DETERMINATION OF TOTAL PETROLEUM HYDROCARBONS (TPH'S) BY INFRARED SPECTROPHOTOMETRY WITH FOURIER TRANSFORMS IN FORTIFIED SOILS 61

RESUMEN 61

INTRODUCCIÓN 63

I. MATERIALES Y MÉTODOS 66

II. RESULTADOS 68

III. DISCUSIÓN 71

IV. CONCLUSIONES 72

LITERATURA CITADA 74

DETERMINACIÓN, CUANTIFICACIÓN Y COMPARACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE VITAMINA C EN NARANJA (*Citrus aurantium*), LIMÓN (*Citrus aurantifolia*) Y MANDARINA (*Citrus reticulata*) POR HPLC

Fernanda Montaña A. • Pablo Pozo P. 77

DETERMINATION, QUANTIFICATION AND COMPARISON OF THE CONCENTRATION THE VITAMIN C IN ORANGE (*Citrus aurantium*), LEMON (*Citrus aurantifolia*) AND TANGERINE (*Citrus reticulata*) BY HPLC 77

RESUMEN 79

INTRODUCCIÓN 80

I. METODOLOGÍA 81

II. RESULTADOS 83

III. DISCUSIÓN 87

IV. CONCLUSIONES 88

LITERATURA CITADA 90



FORMULACIÓN DE UN FITOFÁRMACO A PARTIR DE LAS HOJAS DE *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (ISHPINGO) 93

Yolanda Jibaja A. • Marco Dehesa • Migdalia Miranda

FORMULATION OF A PHYTOMEDICINE FROM LEAVES OF <i>Ocotea quixos</i> (Lam.) Kosterm. (ISHPINGO)	93
RESUMEN	95
INTRODUCCIÓN	96
I. OBJETIVOS	97
II. MATERIALES Y MÉTODOS	98
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	100
IV. CONCLUSIONES	109
LITERATURA CITADA	111

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ESTRUCTURA QUÍMICA DEL ANETOL EXTRAÍDO DEL ANÍS ESTRELLADO (*Illicium verum*) CON EL PRODUCTO SINTÉTICO Y COMPUTACIONAL 113

María Fernanda Pilaquina • Lorena Meneses

COMPARATIVE STUDY OF THE CHEMICAL STRUCTURE OF ANETHOLE ISOLATED FROM STAR ANISE (<i>Illicium verum</i>) WITH THE SYNTHETIC AND COMPUTATIONAL PRODUCT	113
RESUMEN	115
INTRODUCCIÓN	116
I. OBJETIVO	117
II. MATERIALES Y MÉTODOS	118
III. RESULTADOS	120
IV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	121
V. CONCLUSIONES	123
LITERATURA CITADA	124



**PERFIL LIPÍDICO
Y CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS TRANS
EN PRODUCTOS ECUATORIANOS DE MAYOR CONSUMO 125**

Pablo López Proaño • Pablo Pozo Pantoja • Andrea Guzmán

LIPID PROFILE AND CONTENT IN TRANS FATTY ACID OF GREATER CONSUMER PRODUCTS ECUADORIANS	125
RESUMEN	127
INTRODUCCIÓN	129
I. MUESTREO	131
II. METODOLOGÍA DE ANÁLISIS	132
III. RESULTADOS	133
IV. DISCUSIÓN	140
V. CONCLUSIONES	142
LITERATURA CITADA	144

AISLAMIENTO Y
CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE
ESENCIAL DE ALBAHACA,
Ocimum basilicum L.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION
OF BASIL'S ESSENTIAL OIL, *Ocimum basilicum L.*

CRISTINA MENA P.

Recibido 26 de marzo de 2012

Aceptado 9 de abril de 2012



AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE ALBAHACA, *Ocimum basilicum L.*

Cristina Mena P.¹

PALABRAS CLAVES: Albahaca, *Ocimum basilicum L.* aceite esencial, CG-EM

KEY WORDS: Basil, *Ocimum basilicum L.* essential oil, GC-MS

RESUMEN

En esta investigación se caracterizó químicamente el aceite esencial de *Ocimum basilicum L.*, y se determinó mediante la técnica de Bauer y Kirby la actividad antimicrobiana contra cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella tify*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*.

El aceite esencial se extrajo mediante destilación por arrastre de vapor, obteniéndose un rendimiento del 1.39 %. Se determinaron las características físico-químicas y correspondieron con las cuales se reportan para esta especie. El análisis químico y la identificación se

realizaron por cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (CG-EM). El componente mayoritario de *Ocimum basilicum L.*, fue el eugenol (59.87%), seguido de cariofileno (12.03%), eucaliptol (4.40%), linalol (2.46%), β elemeno (3.69%), α cariofileno (2.21%), además se realizó el tamizaje fitoquímico donde se evidenció la presencia de alcaloides, flavonoides, resinas, azúcares reductores, fenoles y taninos, lactonas, triterpenos y esteroides.

Los resultados de las pruebas antimicrobianas mostraron que el aceite esencial de albahaca posee una gran actividad inhibitoria contra las cepas gram negativas de *Klebsiella*

¹ Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Quito, Ecuador, (cemena@puce.edu.ec).



pneumoniae, *Salmonella tify* y menor efectividad sobre organismos gram positivos como *Staphylococcus aureus*. Para *Candida albicans* presentó un gran poder antimicótico.

En este estudio se demostró que en el aceite esencial de *Ocimum basilicum L.*, podrían encontrarse principios activos útiles como alternativas terapéuticas futuras.

ABSTRACT

In this investigation it was characterized the essential oil of *Ocimum basilicum* chemically L. and it was determined by means of the technique of Bauer and Kirby the activity antimicrobiana against stumps of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella tify*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*.

The essential oil was extracted by means of distillation by haulage of vapor, being obtained a yield of 1.39%. The physical characteristics were determined-chemical and they corresponded with those that are reported for this

species. The chemical analysis and the identification were carried out for chromatografía of gases coupled to a spectrometer of masses (CG-EM). The majority component of *Ocimum basilicum L.* was the eugenol (59.87%), followed by cariofileno (12.03%), eucaliptol (4.40%), linalol (2.46%), β elemeno (3.69%) and α cariofileno (2.21%), was also carried out the tamizaje fitoquímico where it was evidenced the presence of alkaloids, flavonoides, resins, sugars reducers, fenoles and tannins, lactonas, triterpenos and steroids.

The antimicrobial test results showed that the essential oil of basil has a high inhibitory activity against gram negative strains of *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella tify*, and less effective on gram positive organisms such as *Staphylococcus aureus*. For *Candida albicans* antifungal presented a great power.

In this study it was demonstrated that in the essential oil of *Ocimum basilicum L.* could be useful active principles as future therapeutic alternatives.



INTRODUCCIÓN

El Ecuador es un país con una geografía muy particular, que determina la existencia de una gran variedad de pisos climáticos, por lo cual se encuentra aproximadamente el 10% de todas las especies de plantas del mundo. Es poseedor además de una gran riqueza ancestral en la utilización de plantas como medicamentos. Pese a esto, la flora medicinal ecuatoriana ha sido muy poco estudiada en el país ya que no existen investigaciones dirigidas a evaluar en forma sistemática el potencial biológico, principios activos y toxicidad que permitirían su real validación e incorporación de estos recursos fitoterapéuticos a la farmacopea nacional, (Naranjo & Escaleras, 1995).

Por esta razón, las plantas requieren un redescubrimiento científico, siendo imperativo realizar estudios conducentes a un mejor aprovechamiento, conservación y búsqueda de sustancias con acción terapéutica, (Harborne & Baxter, 1993).

Las especies del género *Ocimum*, conocidas comúnmente como albahacas son plantas aromáticas que tienen importancia económica y cuyos aceites esenciales son usados en la industria de cosméticos, alimentos y productos farmacéuticos, (Wagner, 1997).

Además, a los aceites esenciales presentes en miembros de la familia Lamiaceae se les atribuyen propiedades antigripales, antipiréticas, antiespasmódicas, antidiarreicas, antifúngicas y antibacterianas, entre otras, (Janssen & Baerheim, 1987).

Varios investigadores han reportado la actividad inhibitoria de los aceites esenciales provenientes de *Ocimum basilicum* sobre bacterias mesófilas, levaduras y hongos filamentosos; sin embargo, no existen los reportes en los cuales se determina el poder inhibitorio de los aceites esenciales de las especies del género *Ocimum*, contra bacterias que han generado mecanismos de resistencia a la terapia antibiótica convencional.

Es por ello que en este estudio se realizó la extracción y caracterización del aceite esencial de *Ocimum basilicum* L., a través de la determinación de sus propiedades físicas como olor, color, densidad relativa, índice de refracción y residuo de vaporación. El análisis de la composición química se realizó en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas.

La actividad inhibitoria del aceite esencial se analizó mediante la me-

dición de los halos de inhibición frente a cinco microorganismos multirresistentes como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella tiphy*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, comparados con los controles gentamicina y clotrimazol.

La investigación se complementa con el tamizaje fitoquímico que muestra los metabolitos secundarios presentes en la planta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

La albahaca fue colectada en la Reserva Forestal "JATUN SACHA" ubicada en Misahuallí, Tena, Ecuador, bosque húmedo tropical (1° 04'S; 77° 36'W), altitud 450 msnm. Luego de la recolección se examinaron y separaron manualmente las partes deterioradas, manchadas y con señales de ataques por insectos. A continuación se lavó el material vegetal con una solución de hipoclorito de sodio al 1 % para reducir la carga bacteriana y se dio paso al proceso de secado a temperatura ambiente por 5 días. La identificación taxonómica se realizó en el Herbario de la PUCE.

Valoración de *Ocimum basilicum L.*

Para el estudio macromorfológico de las hojas se tomó un tamaño de muestra (n = 50) y con la ayuda de una regla milimetrada se estableció el

ancho y largo de las mismas para luego realizar un histograma de cada parámetro. Para su evaluación fisicoquímica se determinaron cenizas totales, solubles en agua e insolubles en ácido.

Estudio Químico Cualitativo

Se realizó tamizaje fitoquímico en extractos acuosos, etéreos y alcohólicos de la planta a los cuales mediante diferentes reacciones de coloración evidenciaron la presencia o ausencia de varios constituyentes como: alcaloides, lactonas y coumarinas, triterpenos, catequinas, resinas, saponinas, etc.

Extracción y Caracterización del Aceite Esencial

El aceite esencial se obtuvo mediante destilación por arrastre de vapor, para lo cual se trocó la planta y se transfirió a un balón de destilación de 2 L a



través del cual se hizo pasar vapor de agua por el lapso de 2 horas. Los volátiles condensados se recibieron sobre agua saturada con cloruro de sodio. Finalizada la destilación se colocó el destilado en un embudo de separación, se añadió una porción de éter dietílico, se agitó y dejó decantar la fase acuosa.

El extracto etéreo se colocó en un frasco ámbar y se añadieron 0.5 g de sulfato de sodio anhidro. Se evaporó el solvente cuidadosamente a temperatura ambiente.

Para caracterizar el aceite esencial se realizaron una serie de ensayos o controles: caracteres organolépticos y especificaciones de tipo físico y químico como densidad relativa, índice de refracción, residuo de vaporación.

Para comprobar las propiedades biológicas del aceite esencial de albahaca, se llevó una muestra al Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad CIVABI y se aplicó el método descrito por Bauer y Kirby, en el cual se estableció la actividad antibacteriana, mediante la utilización de 5 microorganismos seleccionados: *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*,

Klebsiella pneumoniae, *Candida albicans* con el empleo de la técnica de difusión en agar Muller Hinton en diferentes concentraciones de aceite: 10, 20 y 30 μ L, con la utilización del control gentamicina para las bacterias y clotrimazol para las levaduras y la medición de los halos de inhibición luego de un período de incubación de 24 horas.

Los componentes químicos del aceite esencial de albahaca obtenido, fueron separados e identificados mediante un cromatógrafo de gases Varian 3900 acoplado a un espectrómetro de masas Varian Saturn 2100D GC/MS, equipado con una columna capilar de sílica fundida de 30 metros de largo y 0.25 mm., de diámetro y helio como gas de arrastre (1.2 mL min⁻¹). La energía de los electrones ionizantes fue de 70 eV. Se empleó un programa de temperatura en el equipo, iniciándose el proceso a 50°C durante 2 minutos, luego se incrementó la temperatura a razón de 20°C/min hasta 100°C y de inmediato hasta 220°C a razón de 5°C/min. La temperatura del inyector se mantuvo a 250°C. La relación de reparto fue de 1:200. Para la identificación de los componentes del aceite se usó la base de datos Nist 2001.

II RESULTADOS

Valoración de *Ocimum basilicum L.*

El material vegetal constituido por las partes aéreas de la albahaca es de color verde, olor intenso y sabor picante. Los tallos son cuadrangulares y presentan hojas pecioladas, opuestas, de forma aovado-elípticas, de 5.1 cm., de largo y 2.4 cm., de ancho y algo vellosas en los nervios, ápice agudo y la base redondeada. Las flores en largos ramilletes terminales son de color blanco.

En la Tabla 1 se muestran los resultados de los parámetros fisicoquímicos conocidos en la especie vegetal estudiada.

Tabla 1: Resultados de parámetros fisicoquímicos de *Ocimum basilicum L.*

ENSAYO	PORCENTAJE
Cenizas totales	7.71
Cenizas solubles en agua	3.70
Cenizas insolubles en ácido clorhídrico	0.84

Estudio Químico Cualitativo

Los resultados del tamizaje fitoquímico realizados en los extractos etéreo, alcohólico y acuoso de la planta de albahaca, se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2: Resultado del tamizaje fitoquímico de *Ocimum basilicum L.*, en diferentes extractos

METABOLITO	EXTRACTO		
	Etéreo	Alcohólico	Acuoso
Aceites y grasas	-		
Alcaloides	+	+	+
Lactonas y coumarinas	+	+	
Triterpenos y esteroides	+	+	
Catequinas		-	
Saponinas		-	-
Resinas		+	
Azúcares reductores		+	+
Fenoles y taninos		+	
Aminoácidos		-	
Flavonoides		+	+
Cardenolidos		-	
Antocianidinas		-	
Quinonas		-	
Taninos			+
Mucílagos			-

(+) presencia,
 (-) ausencia
 No aplica en
 el extracto



Extracción y Caracterización del Aceite Esencial

Tabla 3: Características físico-químicas de *Ocimum basilicum* L.

Característica	Resultados
Rendimiento	1.39 %
Olor	Dulce, agradable
Color	Transparente
Densidad relativa	0.98
Índice de refracción	1.52
Residuo de evaporación	21%

Tabla 4: Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Ocimum basilicum* L.

Microorganismo	Concentración de Aceite Esencial			Antibiótico
	10 mL	20 mL	30 mL	10 mL
Halos de inhibición (mm)				
<i>Salmonella typhi</i>	12	15	18	13 *
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	24	39	17 *
<i>Escherichia coli</i>	10	15	21	14 *
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14	22	33	14 *
<i>Candida albicans</i>	12	30	41	15**

* Gentamicina

** Clotrimazol

Análisis e Identificación Química del Aceite Esencial

En la Tabla 5 se indican los compuestos identificados, con señalamiento

de los 6 componentes mayoritarios: eugenol (59.87 %), cariofileno (12.03 %), eucaliptol (4.40 %), linalol (2.46 %), β elemeno (3.69%) y α cariofileno (2.21 %).



Tabla 5: Compuestos identificados en aceite esencial de albahaca, caracterizado por cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas

Número	Tiempo de retención (min)	Compuesto	Área relativa %
1	7.138	α pineno	1.920
2	7.233	eucaliptol *	4.395
3	8.259	linalol *	2.460
4	9.631	Benzofurano	0.352
5	9.873	Borneol	0.112
6	10.277	α terpineol	0.842
7	13.324	Elemeno	0.773
8	13.752	Eugenol *	59.868
9	14.601	β elemeno *	3.694
10	15.415	Cariofileno *	12.030
11	16.246	α cariofileno *	2.211
12	16.356	Aromandreno	0.583
13	16.819	β cubebeno	0.386
14	17.031	β seileno	0.966
15	17.450	Eremofileno	0.673
16	19.213	óxido de cariofileno	0.460

* Componentes mayoritarios



En la Figura 1 se observa el espectro de masas de Eugenol que es el componente mayoritario de dicho aceite.

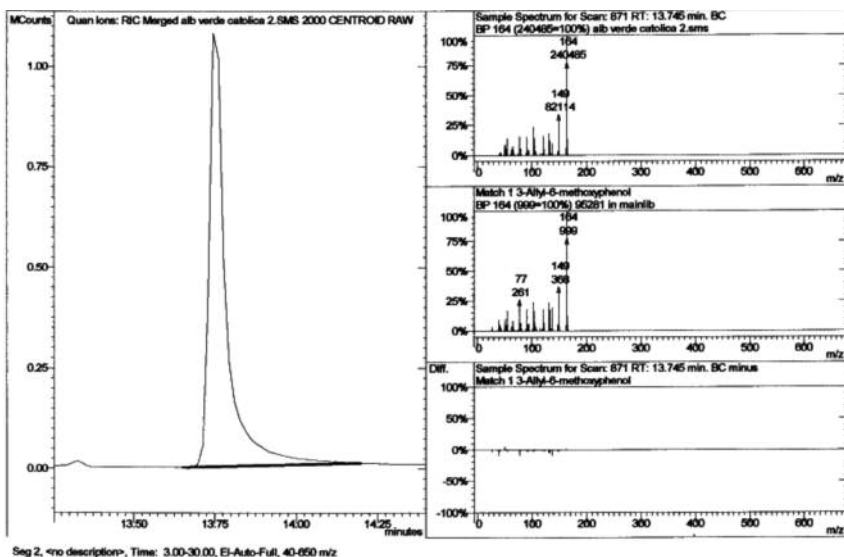


Figura 1: Espectro de masas de Eugenol componente mayoritario del aceite esencial de albahaca

III DISCUSIÓN

El contenido de cenizas totales en *Ocimum basilicum L.*, fue de 7.71%, valor que se encuentra dentro de los rangos establecidos, por Sánchez en el estudio farmacognóstico de *Ocimum basilicum L.*, realizado en Habana, Cuba en el 2000, y de este valor el 50 % son cenizas solubles en agua, lo cual indica que se trata de metales de baja toxicidad.

Además, el porcentaje de cenizas insolubles en ácido fue de 0.84 %, lo cual señala que la presencia de sílice, especialmente de arena y tierra silíceas es baja y se encuentra dentro del rango establecido para especies vegetales. (Miranda & Cuellar, 2001)

El screening fitoquímico evidenció la presencia de alcaloides, lactonas y coumarinas, triterpenos y esteroides, fenoles y taninos, resinas, azúcares reductores y flavonoides. Los taninos tienen la propiedad de precipitar las proteínas, por lo cual presentan acción antimicrobiana e informa que para la especie *Ocimum basilicum L.*, el componente químico mayoritario son los taninos. (Fuentes, 1997)

El porcentaje de rendimiento del aceite esencial de albahaca fue de 1.39%, después de 2 horas de destilación, con el empleo de la planta seca troceada. Este valor se asemeja al obtenido mediante hidrodestilación, (Muriillo & Viña, 1999).

El aceite esencial de albahaca a la misma concentración del antibiótico Gentamicina produjo halos de inhibición de tamaños muy parecidos en las cepas bacterianas gram negativas *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhi*, mientras que con bacterias gram positivas como *Staphylococcus aureus* los halos de inhibición fueron de menor tamaño.

Estos resultados avalan lo reportado por Acosta-Gonzales en su investigación sobre la composición química de los aceites esenciales de *Ocimum basilicum L.*, *Ocimum gratissimum L.* y *Ocimum tenuiflorum L.* y su efecto antimicrobiano sobre bacterias multirresistentes de origen nosocomial, (Jawetz, 2005).

También se obtuvo una buena actividad inhibitoria contra *Candida albicans*, al comparar los halos de inhibición del aceite esencial con los del antimicótico estándar clotrimazol.

El análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, permitió conocer la composición química y la abundancia relativa de los principales componentes que conforman el aceite esencial de albahaca. Estos resultados concuerdan con los citados en la investigación de extracción del aceite esencial de albahaca mediante dióxido de carbono supercrítico, donde el eugenol es el compuesto químico más abundante. (Romero, 2000)

IV CONCLUSIONES

Los bajos valores obtenidos en la determinación de cenizas totales nos permitieron concluir que la albahaca re-

colectada para el análisis no estuvo expuesta a productos químicos ni contaminada con metales pesados.



El rendimiento del aceite esencial de albahaca obtenido mediante destilación por arrastre de vapor fue de 1.39 % lo cual indica que es un método eficiente y económico para extracción de aceites esenciales, frente al rendimiento obtenido por fluidos supercríticos con un valor de 1.89 %, diferencia que no es muy significativa si se toma en cuenta, que este último es un método de mayor complejidad y costo.

Los metabolitos secundarios encontrados en los extractos etéreo, acuoso y alcohólico como alcaloides, triterpenos y esteroides, resinas, azúcares reductores, fenoles y taninos, lactonas y flavonoides tienen un gran valor medicinal.

El tamizaje fitoquímico mostró una marcada presencia de taninos lo cual justifica que a la albahaca se le atribuyan propiedades antibacterianas.

Se demostró que el aceite esencial de albahaca posee principios activos importantes que pueden ser alternativas terapéuticas efectivas contra las infecciones producidas por microorganismos resistentes a los antibióticos. Razón por la cual sería interesante intensificar las investigaciones para elaborar fitofármacos a partir de este aceite.

Mediante al análisis cromatográfico y de espectrometría de masas del aceite esencial de albahaca se identificaron 16 compuestos químicos, donde el eucaliptol, linalol, eugenol, cariofileno, α cariofileno y β elemeno fueron los componentes mayoritarios.

Se encontraron en menor porcentaje el α pineno (1.920%), β seileno (0.966%), α terpineol (0.842%), eremofileno (0.673%), aromandreno (0.583%), óxido de cariofileno (0.460%), β cubebeno (0.386%), benzofurano (0.352 %) y borneol (0.112%).

El aceite esencial de albahaca mostró buena actividad inhibitoria, equiparable al antibiótico gentamicina, sobre las cepas bacterianas gram negativas *Klebsiella pneumoniae* (98%) y *Salmonella typhi* (93%), probablemente debido a que en su constitución está presente el eugenol que es un compuesto fenólico al cual se le atribuye acción antibacteriana. Frente a gérmenes gram positivos como *Staphylococcus aureus* se obtuvo una actividad inhibitoria moderada (62%).

Además se obtuvo una buena actividad inhibitoria (80%) para *Candida albicans* respecto al antimicótico clotrimazol.

LITERATURA CITADA

- Acosta, M. (1992). *Vademécum de Plantas Medicinales del Ecuador*, Quito, Ecuador, Ediciones Abya Yala.
- Acosta, M & Gonzales, M. (1999). *Composición química de los aceites esenciales de Ocimum basilicum L. Var basilicum. Ocimum basilicum L. Var purpurensens y su efecto antimicrobiano sobre bacterias multi-resistentes de origen nosocomial*.
- Acosta, M. (1992). *Vademécum de plantas medicinales del Ecuador*, Quito, Ecuador, Abya-Yala.
- Basil*, recuperado el 01 de noviembre de 2006, <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/CropFactSheets/basil.html>.
- Berk, Z. (1980). *Introducción a la Bioquímica de los alimentos de JBS Bravermen*, México D.F., Editorial El Manual Moderno.
- Bravermen, Z. (1980). *Introducción a la Bioquímica de los alimentos*, México D.F., Editorial El Manual Moderno.
- Brown, D. (1996). *The Royal Horticultural Society; Enciclopedia de las Hierbas y sus Usos*, Verona, Italia.
- Cecchini, T. (1973). *Enciclopedia de las Hierbas y de las Plantas Medicinales*, Barcelona, España, Editorial De Vecchi.
- Estrella, E. & Crespo, A. (1993). *Tratado de cooperación amazónica, Volumen II*, Quito, Ecuador, Impretec.
- Families*, Latinoamerican Quimic.
- Fuentes, V & Granda, M. (1997). *Conozca las plantas medicinales*, Habana, Cuba, Editorial Científico Técnica.
- Fundación Ecuatoriana de Tecnología Apropiada, (2000). *Ficha Técnica de la Albahaca*, Quito, Ecuador [s.n].
- Gangrade, S. (1990). *Evaluation of antibacterial properties of essential oil of Ocimum species*, Trivedi KC.
- García, D. (2006). *Albahaca Blanca*, recuperado el 23 de enero de 2007, <http://www.geocities.com/Athens/Cyprus/6164/fotosocimumbasilicum.htm>.
- García, D & Pupo, S. (1998). *Estudio farmacognóstico de Ocimum gratissimum L.*, recuperado el 24 de agosto de 2006, http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol3_1_98/pla07198.htm.
- Gil, E & Saez, A. (2000). Obtención del aceite esencial de cardamomo. *Revista Universidad EAFIT*, N. 30, 15-20.
- Gonzales, D. (1994). *Utilización terapéutica de nuestras plantas medicinales*, Bogotá, Colombia, Ediciones Tercer Mundo.
- Harborne, J.B & Baxter, H. (1993). *Phytochemical Dictionary*. Londres. Taylor y Francis.
- Iglesias, O. (1990). *El uso de las plantas en la medicina tradicional de los quechuas*



del Napo, Quito, Ecuador, Abya-Yala.

Janssen, A.M., Sheffer, J.J & Baerheim, A. (1987). *Antimicrobial activity of essential oils*. Planta Med.

Jawetz, M. (2005). *Microbiología médica*, 18 edición, España, Editorial El Manual Moderno. SA.

Mahair, P. (1995). *Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo CYTED/ 270 plantas medicinales Iberoamericanas*, Bogotá, SECAB.

Mejía, L. (2000). *Agroecología y Métodos Alternativos, Memorias del curso de complementación académica*, Quito, Ecuador.

Miranda M, Cuellar A. (2001). *Farmacognosia y Productos Naturales*, Cuba, Edit. Félix Varela.

Miranda M, Cuellar A. (2001). *Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia y productos naturales*, Cuba, Edit. MES.

Muñoz, F. (1987). *Plantas Medicinales y Aromáticas, Estudio, Cultivo y Procesado*. Madrid, España, Ediciones Mundi Prensa.

Murillo, E. & Viña, P. (1999). *Determinación de constituyentes volátiles de la albahaca mediante dos métodos de extracción*, recuperado el 20 de julio de 2006, www.fao.org/inpho/content/vlibrary/ad417s/ad417s00.pdf.

Naranjo, P & Escaleras, R. (1995). *La Medicina Tradicional en el Ecuador, Volumen II*, Quito, Ecuador, Corporación Editora Nacional.

Pahlow, M. (1994). *El Gran Libro de las Plantas Medicinales; La Salud Mediante las Fuerzas Curativas de la Naturaleza*, 7ª. Ed, Madrid, España, Editorial Everest.

Rinaldi, C. (1989). *El Cultivo Moderno y Rentable de las Plantas Aromáticas y Medicinales*, Barcelona, España, Editorial De Vecchi.

Romero, P. (2000). *Extracción del aceite esencial de albahaca mediante dióxido de carbono supercrítico*, Venezuela.

Sánchez, E & Leal, I. (2000). *Estudio farmacognóstico de Ocimum basilicum L.*, recuperado el 20 de abril de 2006, http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034751520030006&script=sci_arttext&tling=es.

Senatore, F. (2002). *Oli Essenziali, Provenienza, estrazione ed analisi chimica*, Italia, EMSI.

Sharapin, N. etal. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*, 1ra., edición, Bogotá, Colombia, Ciencia y Tecnología.

Simon, J.E. (1990). *Essential Oils and Culinary Herbs; Advances in New Crops*, recuperado el 20 de diciembre de 2006, <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/proceedings1990/V1-472.html>.

Stashenko, E. (1998). *Aceites esenciales: Técnicas de extracción y análisis*, Bucaramanga, Colombia, Editorial Santander.

Ullman, D. (1981). *Enciclopedia de Química Industrial*, España.



Villacrés, V. (1995). *Bioactividad de plantas amazónicas*, Quito, Ecuador, Edit Abya-Yala.

Villaroel, F. (1991). *Introducción a la Botánica Sistemática*, Quito, Ecuador, UCE.

Wagner, H. (1997). *Pharmaceutical and economic use of the Labiatae and Rutaceae*

White, A. (1982). *Hierbas del Ecuador*, Quito, Ecuador, Libri Mundi.

DESARROLLO Y VALIDACIÓN
DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS PARA
COMPUESTOS FENÓLICOS EN
AGUAS SUPERFICIALES,
RESIDUALES Y DE CONSUMO,
POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA
DE ALTA EFICIENCIA

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN
ANALYTICAL METHOD FOR PHENOLIC
COMPOUNDS IN SURFACE WATER, WASTEWATER
AND DRINKING WATER BY HIGH
PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

ANA ALEJANDRA HIDALGO A.
ALEXANDRA P. HIDALGO J.

*Recibido 26 de marzo de 2012
Aceptado 9 de abril de 2012*



DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS PARA COMPUESTOS FENÓLICOS EN AGUAS SUPERFICIALES, RESIDUALES Y DE CONSUMO, POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA

Ana Alejandra Hidalgo A.¹, Alexandra P. Hidalgo J.¹

PALABRAS CLAVES: Fenoles, Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia, Extracción en Fase Sólida, agua

KEY WORDS: Phenols, High Performance Liquid Chromatography, Solid Phase Extraction, water

RESUMEN

El fenol y sus derivados son compuestos químicos orgánicos, de amplia utilización en la industria, lo cual conduce a una alta probabilidad de exposición a ellos ya sea por inhalación, ingestión o contacto con la piel. Las principales fuentes de contaminación con fenoles son las aguas residuales, desechos industriales, agua potable

contaminada, ambientes de trabajo contaminados, entre otros.

Se desarrolló un método que sea confiable técnicamente, para el análisis de compuestos fenólicos en aguas superficiales, residuales y de consumo por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE), mediante la utilización de extracción en fase sólida (EFS) para la preparación, extracción y con-

¹ Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, CESAQ, Quito, Ecuador (aphidalgo@puce.edu.ec).

centración de muestras. Este método fue validado y aplicado a muestras reales de las matrices mencionadas y finalmente comparado con el método estándar SM 5530 Fenoles (Totales) (Gidding, 1973). Esto permitió obtener un método de análisis que pueda ser utilizado para evaluar el grado de contaminación por fenoles de las diferentes fuentes de agua del Distrito Metropolitano de Quito (superficiales, potables, embotelladas y residuales).

El desarrollo del método contempló la prueba de las condiciones óptimas de EFS: pH, cantidad de muestra y eluyente. Se optimizaron las condiciones cromatográficas para CLAE en una columna monolítica de fase reversa (RP-C8), al probar las fases móviles (metanol, acetonitrilo), pH, flujos, gradiente y cuantificación con un detector UV-VIS.

Se evaluaron estadísticamente la exactitud, selectividad, sensibilidad y eficacia del método mediante su validación con estándares, material de referencia certificado y fortificación de muestras de las tres matrices mencionadas, encontrándose coeficientes de variación para la precisión de repetibilidad y reproducibilidad menores al 5%, una recuperación de Material de Referencia Certificado entre 94 y 100%.

Como resultado del desarrollo y la validación, se obtuvo un método para el análisis de los siguientes diez fenoles en el rango de 0.001 a 0.5 mg/L para cada uno: fenol; 4-nitrofenol; 2-clorofenol; 2-nitrofenol; 2,4-dinitrofenol; 2,4-diclorofenol; 4-cloro-3-metilfenol; 4,6-dicloro-2-metilfenol; 2,4,6-triclorofenol y pentaclorofenol.

El método desarrollado y validado se comparó con el método estándar SM 5530 por espectrofotometría ultravioleta-visible; se encontró una mejor recuperación de material de referencia al usar el método propuesto, además de tener ventajas como disminución de solventes tóxicos, menor cantidad de muestra y posibilidad de cuantificación de fenoles individuales.

El método analítico desarrollado se aplicó posteriormente a un estudio de cuantificación de fenoles en el agua del Río Papallacta, agua potable de la Planta de Bellavista, agua embotellada de diferentes marcas y agua residual de cuatro industrias locales del Distrito Metropolitano de Quito. El propósito del estudio fue evaluar la calidad del recurso agua en la zona, con relación a los fenoles y a la vez incentivar a la prevención de la contaminación.

Los resultados obtenidos del



análisis de fenoles muestran que no existe contaminación por dichos compuestos en las muestras tomadas del Río Papallacta, del agua potable de la Planta Bellavista y del agua embotellada. En cuanto a las aguas residuales se observa contaminación por fenoles en las muestras analizadas de la industria hidrocarburífera.

ABSTRACT

Phenol and phenolic compounds are organic chemicals widely used in the industry, this reason leads to a high probability of exposure for humans either by inhalation, ingestion or skin contact. The main sources of pollution with phenols are sewage, industrial wastes, contaminated drinking water, and contaminated work environments, among others.

In this work a method for the analysis of phenolic compounds in surface water, wastewater and drinking water by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), is developed. Solid Phase Extraction (SPE) is used for preparation, extraction and concentration of samples. The method is validated, applied to real samples of the mentioned matrices, and finally compared to the SM 5530 Phenols. (Total) (Gidding, 1973)

The development of the test method provides the optimal conditions for SPE: pH, amount of sample and eluent. The chromatographic conditions for HPLC were optimized in a monolithic reversed phase column (RP-C8). The following variables were tested: mobile phase (methanol, acetonitrile), pH, flow, gradient and detection with a UV-VIS detector.

The accuracy, selectivity, sensitivity and efficiency of the method were statistically evaluated by the validation. For this evaluation we used standards, certified reference material and sample fortification of the three mentioned matrices.

As a result yields a method for the analysis of the following ten phenols in the range of 0.001 to 0.5 mg/L for each phenol: 4-nitrophenol, 2-chlorophenol, 2-nitrophenol, 2,4-dinitrophenol, 2,4-dichlorophenol, 4-chloro-3-methylphenol, 4,6-dichloro-2-methylphenol, 2,4,6-trichlorophenol and pentachlorophenol.

The developed and validated method was compared with SM 5530 using ultraviolet-visible spectrometry, reaching a better recovery of reference material using the proposed method. In addition the following advantages were

observed in developed method: reduction of used toxic solvents, minimal sample volume required, and the possibility of identifying individual phenols.

The validated method was applied to the quantification of phenols in surface waters of the Papallacta River, drinking water from the treatment plant Bellavista, and wastewater from four local industries. The purpose was

to evaluate the water contamination with these contaminants in the area, and encourage the prevention of pollution by phenols.

The results obtained show that the samples analyzed from surface water, drinking water and bottle water; doesn't present phenolic compounds. The wastewater from hydrocarbon industry presents phenols in a high range.

INTRODUCCIÓN

El fenol (ácido fénico o fenílico, hidroxibenceno, bencenol, alcohol fenílico) es un compuesto aromático de fórmula química C_6H_5OH , con peso molecular 94.1 g/mol. Es más denso que el agua y su solubilidad en esta es limitada, 8.3 g por cada 100 mL. Se presenta como un sólido cristalino, puede encontrarse en estado líquido a temperatura ambiente, en la naturaleza se halla en desechos animales y materia orgánica en descomposición. Posee un olor dulce e irritante característico, detectable a tan solo 0.05 mg/Kg en el aire. El umbral de olor para fenol en agua se ha reportado en 7.9 mg/L, y el umbral de sabor 0.3 mg/L. (NIH, 1994).

La estructura química del fenol consiste en un grupo hidroxílico conec-

tado al anillo aromático por un carbono híbrido sp^2 ; esta estructura es la base de todos los compuestos fenólicos. (Bloch, 2006).

Los fenoles o compuestos fenólicos comprenden todas las sustancias derivadas del fenol. Se considera que muchos fenoles, especialmente sintéticos, son tóxicos para los seres humanos, animales y vegetación. Existe una gran variedad de compuestos fenólicos, son once los más importantes desde el punto de vista analítico:

- Fenol (C_6H_5OH)
- 2,4-dimetilfenol (C_8H_9OH)
- 2-clorofenol (ClC_6H_4OH)
- 4-cloro-3-metilfenol (ClC_7H_6OH)
- 2,4-diclorofenol ($Cl_2C_6H_3OH$)



- 2,4,6-triclorofenol ($\text{Cl}_3\text{C}_6\text{H}_2\text{OH}$)
- Pentaclorofenol ($\text{C}_6\text{Cl}_5\text{OH}$)
- 2-nitrofenol u o-nitrofenol ($\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2\text{OH}$)
- 4-nitrofenol o p-nitrofenol ($\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2\text{OH}$)
- 2,4-dinitrofenol ($\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_2\text{O}_4\text{OH}$)
- 2-metil-4,6-dinitrofenol ($\text{C}_7\text{H}_5\text{N}_2\text{O}_4\text{OH}$)

Los efectos en la salud por la exposición a fenol y compuestos fenólicos, son principalmente envenenamiento del sistema nervioso central que puede ocasionar un colapso o coma. Además la exposición crónica puede causar daño en la piel, afecciones en las mucosas de boca y garganta, y efectos en riñones, corazón, fibras nerviosas e hígado.

Estos compuestos se emiten al ambiente por: emisión proveniente de la combustión interna de vehículos, transformación fotoquímica de precursores como benceno, tolueno y radicales hidroxilo, aplicación de plaguicidas y descargas industriales; por ejemplo el plaguicida organofosforado, Paratión al degradarse forma nitrofenol muy rápidamente (Gidding, 1973).

El fenol y algunos de sus derivados son considerados tóxicos para el ambiente, causando efectos perjudicia-

les para el agua, aire y suelo. Al disolverse en el agua, aun en bajas concentraciones, los fenoles forman soluciones tóxicas perjudiciales para las fuentes de aguas de consumo y el hábitat de animales y plantas. Al entrar en contacto con el aire y calor pueden oxidarse y llegar a formar mezclas explosivas. En el suelo no permanecen por mucho tiempo debido a la degradación microbiana propia de este medio.

La contaminación del recurso agua es un problema global y en la actualidad se invierte mucho esfuerzo para detener y revertir los efectos dañinos que causa. Los fenoles, como contaminantes, causan alteraciones físicas y químicas en el agua. En el aspecto físico le confieren olor y sabor desagradables, especialmente si se trata de clorofenoles. Químicamente, reaccionan con otros contaminantes y en muchas ocasiones los productos son aun más tóxicos. Debido a su solubilidad en el agua, se han encontrado cantidades más altas de compuestos fenólicos en aguas naturales que reciben descargas de estos, que en el ambiente que las rodea. No solo la industria aporta con fenoles al agua; además se tiene contaminación por aplicación de plaguicidas y uso de productos que los contienen.

La contaminación del agua por

compuestos fenólicos genera problemas de salud pública y deterioro de este preciado recurso natural. Al contaminar aguas naturales con efluentes residuales u otros medios que contienen fenoles, estos compuestos pueden llegar al agua de consumo que las personas ingieren. Es así que el análisis de compuestos fenólicos en agua es muy importante, al igual que el desarrollo de una técnica para analizarlos que sea estandarizada, sensible, rápida, limpia y accesible por su costo.

El presente estudio tiene como objetivo desarrollar, optimizar y validar un método de análisis confiable de

compuestos fenólicos en aguas superficiales, de consumo y residuales, que pueda ser aplicado para evaluar el grado de contaminación por fenoles en las diferentes fuentes de agua del Distrito Metropolitano de Quito.

Se plantea desarrollar un método para el análisis de fenoles totales en agua mediante Extracción en Fase Sólida y Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia. Validar el método desarrollado para determinación de fenoles por CLAE. Finalmente, aplicar el método de determinación de fenoles por CLAE para un estudio en aguas superficiales, residuales y de consumo dentro del DMQ.

I MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología clásica de análisis de fenoles totales en agua, usa la derivatización (reacción con 4-aminoantipirina a pH 10) de estos compuestos para generar un complejo coloreado, que es extraído con cloroformo y se analiza mediante espectrofotometría UV-VIS. Dicha técnica requiere de una destilación ácida previa de la muestra para eliminar interferencias. Método SM de la American Public Health Association (APHA) 5530 Fenoles (Totales). (APHA, AWWA, WEF, 2005).

La técnica espectrofotométrica no posee la sensibilidad exigida por normas internacionales y con esta no se pueden determinar los compuestos fenólicos individuales. Otro problema es la toxicidad por la gran cantidad de cloroformo requerida para el análisis.

Métodos más específicos para la determinación de fenoles en agua han sido desarrollados con el uso de técnicas cromatográficas; con estos se llega a un nivel mayor de sensibilidad y es posible la determinación de compuestos fenólicos individuales.



La Cromatografía de Gases, con el empleo de los detectores de ionización de llama, captura de electrones y espectrometría de masas; es muy utilizada por su sensibilidad y selectividad. Sin embargo, los pasos previos de preparar, concentrar y derivar, para el análisis en fase gaseosa son largos y tienen un alto costo. Método SM 6420 Fenoles (Compuestos Individuales) (APHA, AWWA, WEF, 2005).

La Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE) o sus siglas en inglés HPLC, es una técnica aplicada recientemente que ofrece la enorme ventaja de no necesitar que la muestra se encuentre en fase gaseosa para ser analizada. Esta técnica permite analizar un mayor número de muestras a menor costo, así se pueden realizar estudios de control y monitoreo ambiental de estos contaminantes. La preparación de las muestras consiste en una filtración (0.45 μm) y concentración por Extracción en Fase Sólida, sus siglas en inglés SPE (Solid Phase Extraction). Por ello, se escogió esta técnica analítica para el desarrollo del método objeto de este trabajo.

La metodología de estudio contempló el desarrollo de un método de análisis que sea confiable, para lo cual fue necesario revisar las diferentes alter-

nativas bibliográficas, realizar modificaciones de acuerdo con el desempeño y con los objetivos planteados, optimizar las condiciones analíticas y finalmente validarlo, a través de repeticiones controladas de análisis de estándares, blancos, material de referencia certificado y fortificaciones, en las tres matrices de agua (superficial, de consumo y residual). Los resultados se analizaron mediante técnicas estadísticas y se comprobó el cumplimiento de los objetivos planteados. Además se compararon los resultados obtenidos por el método desarrollado con la metodología clásica por espectrofotometría UV-VIS.

La eficacia del método fue estudiada mediante la realización de análisis de compuestos fenólicos en agua de diferentes fuentes dentro del Distrito Metropolitano de Quito.

EQUIPOS

- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia marca HITACHI, modelo Elite LaChrom. Bomba recíproca dual tipo Tandem modelo L-2130 con unidad de gradiente de baja presión y desgasificador, automuestreador modelo L-2200, detector UV-VIS de doble haz modelo L-2420 y horno de columnas modelo L-2350
- Columna para cromatógrafo líquido



de alta eficiencia Waters Symmetry C8 de 5µm, 3,0 x 150 mm

- Pre columna Waters Sentry Guard
- Cartuchos de Extracción en Fase Sólida Oasis HLB, 3 cc, 60 mg. El sorbente es un copolímero con balance hidrofílico - lipofílico
- Manifold Waters de 20 posiciones
- Sistema Purificador de agua ELGA
- Balanza Analítica Mettler Toledo con resolución de 0,1mg
- Micropipetas de 20 - 200 µL, marca Microlit
- pHmetro HACH, Sension 1
- Bomba de vacío Waters
- Rotavapor Heildolph
- Ultrasonido Branson

REACTIVOS

- Acetonitrilo grado HPLC
- Metanol grado HPLC
- Agua grado HPLC (conductividad < 0.1 µS/cm)
- Ácido Acético grado HPLC
- Ácido Clorhídrico grado analítico, solución al 10%
- Ácido Fosfórico grado analítico, solución al 10%
- Éter Etílico grado analítico
- Acetato de Sodio grado analítico

ESTÁNDARES Y MATERIALES DE REFERENCIA

- Estándares de compuestos fenólicos individuales Chemservice
- Estándar Chemservice Mixture #9-Phenols 2000 µg/mL en Cloruro de metilo. Lote 393-64B. Solución stock. Material de Referencia Certificado ERA PriorityPollutnT™ Acidos. Lote P139-712

MATERIALES

- Filtros descartables Millipore, Mille de 0.45 µm
- Balones aforados clase A calibrados de 1mL, 5 mL, 10 mL y 100 mL
- Pipetas pasteur
- Vasos precipitación de 50 mL, 100 mL y 250 mL
- Pipetas volumétricas clase A calibradas de 1 mL, 2 mL y 5 mL
- Pipetas serológicas de 5 mL
- Viales ámbar 4 mL
- Jeringas 3 mL

DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

El método de análisis contempla dos etapas: 1) preparación de la muestra a través de la Extracción en Fase Sólida. 2) separación y cuantificación de los analitos, a través del análisis por Cro-



matografía Líquida de Alta Eficiencia. Por ello, se presentan las actividades realizadas tanto en la metodología como en los resultados, para cada una de estas etapas:

Extracción en Fase Sólida

Los cartuchos de extracción en fase sólida usados para la preparación de las muestras fueron de marca Waters, Oasis, HLB, 3 cc, 60 mg. Primero se realizaron pruebas con el método genérico recomendado por el fabricante de los cartuchos de extracción en fase sólida (Water Chromatography, 1998). Después se realizaron pruebas con la modificación de los solventes de acondicionamiento y elución, según recomendaciones del fabricante de la columna (Waters Corporation, 2002). Para cada prueba se realizó el análisis por quintuplicado de un estándar limpio de 0.30 mg/L de compuestos fenólicos.

Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia

Se recomiendan diferentes condiciones analíticas para la determinación de compuestos fenólicos por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (Caledra Castro, Santos Montes & Izquierdo Hornillos, 2006; Sarno & Delfino, 2007). Estas condiciones fueron proba-

das en el laboratorio para poder determinar el método más adecuado para la separación, detección y cuantificación de fenoles. Las pruebas se realizaron con la inyección de un coctel de fenoles en concentración de 0.3 mg/L y la fase estacionaria utilizada fue una columna de marca Waters Symmetry C8 de 5 μ m, 3.0x150 mm, con una precolumna Waters Sentry Guard C8. Mediante esta columna se realizaron las pruebas detalladas en la Tabla 1.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO

El método analítico desarrollado y optimizado para la determinación de compuestos fenólicos en aguas por extracción en fase sólida y cromatografía líquida de alta eficiencia fue validado de acuerdo con los siguientes parámetros de desempeño, estableciendo los siguientes objetivos:

- Linealidad: determinar la linealidad de las curvas de calibración para el análisis de compuestos fenólicos por EFS-CLAE, cuyo $r^2 > 0.99$.
- Límite de detección: determinar la concentración mínima detectable con un 95% de confianza.
- Límite de cuantificación: determinar la concentración mínima cuantificable con un 95% de confianza, que sea menor o igual a 0.05 mg/L ($U < 30\%$, $k=2$).



- Precisión de repetibilidad: obtener un coeficiente de variación en condiciones de repetibilidad menor o igual al 5% en todos los niveles.
- Precisión de reproducibilidad: obtener un coeficiente de variación en condiciones de reproducibilidad menor o igual al 5% en todos los niveles.
- Exactitud: obtener un error menor o igual al 5% en todos los niveles.
- Intervalo de trabajo: determinar el rango de trabajo para el análisis de fenoles con un nivel de confianza del 95%, (0,001 a 10 mg/L).
- Efecto matriz: obtener recuperaciones entre el 90 y 110% en todas las matrices analizadas.

Finalmente el método desarrollado se comparó con el método estándar SM 5530 Fenoles (Totales). (APHA, AWWA, WEF, 2005).

APLICACIÓN DEL MÉTODO

La aplicación del método desarrollado para análisis de compuestos fenólicos por extracción en fase sólida y cromatografía líquida de alta eficiencia, se realizó en muestras aleatorias tomadas de aguas superficiales, potables, embotelladas y residuales. Se planteó aplicar el método en el análisis del contenido de fenoles en aguas superficiales, al tomar como referencia el Río Papallacta. Además, se analizaron fenoles en aguas de consumo, provenientes de la planta de agua potable de Bella Vista, la de mayor producción del Distrito Metropolitano de Quito (Empresa Metropolitana de Alcantarillado y Agua Potable Quito, 2008) y en aguas embotelladas con diferentes métodos de purificación (ozonización, cloración, osmosis inversa), También se analizaron aguas residuales desechadas por industrias locales.

II RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de muestras reales en la presente investigación responde, únicamente a la necesidad de confirmar la aplicabilidad del método desarrollado, más no representa un estudio estadístico de la contaminación por compuestos fenólicos en las matrices analizadas.

Se desarrolló un método confiable para la determinación de compuestos fenólicos en aguas de consumo, superficiales y residuales, que es aplicable a dichas matrices según la validación realizada. Los resultados obtenidos durante el desarrollo del método, vali-



dándolo, aplicándolo a muestras reales y comparándolo con un método estándar, se detallan a continuación.

DESARROLLO DEL MÉTODO

Extracción en Fase Sólida

Mediante la técnica de extracción recomendada por el fabricante de los cartuchos de extracción en fase sólida (Water Chromatography, 1998) se obtuvieron recuperaciones entre el 59 y 90%. Dadas las bajas recuperaciones, se realizaron modificaciones en el método y se utilizó en lugar de metanol una mezcla metanol/éter etílico (10:90), lo cual produjo recuperaciones entre el 94 y 99 %, por lo cual se aceptó el nuevo método modificado de extracción para la determinación de compuestos fenólicos. Se presenta el procedimiento optimizado en la Figura 1.

Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia

Se presentan los resultados de las pruebas que se realizaron para determinar las condiciones apropiadas del método de cuantificación de fenoles por cromatografía líquida de alta eficiencia.

Determinación de la fase móvil apropiada: las combinaciones más comunes de fases móviles recomendadas son: metanol-agua y acetonitrilo-agua. Al analizar los cromatogramas con cada fase, se encontró que existe una mejor resolución de los picos de los analitos con la fase acetonitrilo-agua, además el tiempo de corrida es menor, de 40 a 50 minutos. Por lo tanto se escogió la fase móvil acetonitrilo-agua para el análisis de compuestos fenólicos.

Se probaron posteriormente dos modificaciones para la fase móvil acetonitrilo - agua: una solución tampón de fosfato monopotásico para el agua y la acidificación de ambas fases al 1% con ácido acético. La solución tampón ofreció una mejora en la resolución de los picos; sin embargo la acidificación de las fases además de mejorar la resolución, minimizó las colas de los picos y se tuvo un menor riesgo de contaminación de la columna por mineralización, por lo cual se escogió esta segunda alternativa.

Determinación del uso de gradiente: inicialmente se probó una separación isocrática de: agua 60 % : acetonitrilo 40 %, que dio como resultado una corrida larga (45 minutos). Para obtener mejores efectos, se probaron diferentes gradientes recomendadas por la biblio-

grafía. (Waters Corporation, 2002), (Caledra Castro, Santos Montes, & Izquierdo Hornillos, 2006), (Sarno & Delfino, 2007).

El método recomendado por el fabricante de la columna cromatográfica (Waters Corporation, 2002), ofreció la mejor separación, se obtuvieron picos con buena resolución, pocas colas y un tiempo de corrida manejable de 38 minutos. Por lo tanto se trabajó con este método, con variación de las condiciones para mejorar la separación cromatográfica, ver Figura 2.

Se optimizaron además otras variables que deben ser controladas para obtener una mejor separación y resolución en cromatografía líquida, como: flujo de fase móvil, volumen de inyección, temperatura de la columna y longitud de onda de detección. Luego de realizar varias pruebas se obtuvieron las condiciones optimizadas para CLAE, detalladas en la Tabla 2.

Una vez determinadas las condiciones cromatográficas adecuadas para la determinación de fenoles, se realizaron soluciones de cada uno de los compuestos fenólicos individuales y se determinó su tiempo de retención y orden de elución. La selectividad del método se ve reflejada en la tolerancia

de los tiempos de retención de cada analito. Ver Tabla 3.

Los picos de los fenoles, no se superponen unos con otros, se obtiene entonces una separación adecuada de todos los compuestos estudiados, como se observa en el cromatograma presentado en la Figura 3.

La cuantificación de compuestos fenólicos se realizó mediante curvas de calibración para cada uno de los analitos, en ellas se relacionó la concentración con el área integrada de los picos cromatográficos.

Una vez desarrolladas y definidas las condiciones óptimas de trabajo para la determinación de compuestos fenólicos por cromatografía líquida de alta eficiencia con extracción en fase sólida, se estableció el procedimiento para determinación de compuestos fenólicos; este procedimiento se utilizó para validar el método y aplicarlo a muestras reales. La figura 4 contiene un esquema del procedimiento desarrollado.

Para obtener el valor de concentración de fenoles totales se realiza la sumatoria de cada uno de los compuestos fenólicos detectados. Así se tiene un índice global.



VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Se realizó la validación del método para determinación de compuestos fenólicos en aguas superficiales, naturales y residuales. Se validaron los diez fenoles que se nombran a continuación: fenol; 4-nitrofenol; 2-clorofenol; 2-nitrofenol; 2,4-dinitrofenol; 2,4-diclorofenol; 4-cloro-3-metilfenol; 4,6-dicloro-2-metilfenol; 2,4,6-triclorofenol y pentaclorofenol. Cada fenol fue analizado durante cinco días, cada día se inyectaron cuatro concentraciones diferentes de estándares, por quintuplicado cada una (un total de 100 análisis). Además se inyectaron blancos, material de referencia certificado y se realizaron fortificaciones con muestras reales. En la Tabla 6 se encuentran los resultados obtenidos para cada parámetro de validación del método, en la cual se observa el cumplimiento de los objetivos planteados inicialmente.

APLICACIÓN DEL MÉTODO

Una vez validado y aceptado el método desarrollado para determinación de fenoles en aguas superficiales, residuales y de consumo por EFS y CLAE, se realizó un pequeño estudio de aplicación del método para las matrices señaladas. La matriz agua de consumo contempló muestras de agua potable

del sector abastecido por la planta de tratamiento de Bellavista en Quito y muestras de aguas embotelladas de cinco marcas diferentes. El agua superficial se tomó del río Papallacta, que abastece a la planta Bellavista. Finalmente la matriz de agua residual se dividió en cuatro submatrices según el sector productivo: alimentos, florícola, hidrocarburos y textil. En la tabla 7 se muestran los resultados de las diferentes muestras analizadas, así como su grado de cumplimiento con respecto a la legislación ambiental ecuatoriana aplicable.

Se puede comprobar que todas ellas cumplen con lo exigido en las normas ambientales, a excepción de las muestras de aguas residuales de la industria de hidrocarburos.

COMPARACIÓN CON EL MÉTODO ESTÁNDAR

Se debe tomar en cuenta que los resultados encontrados al realizar el análisis de compuestos fenólicos por cromatografía líquida de alta eficiencia y extracción en fase sólida, deben ser expresados como la sumatoria de todos los analitos encontrados, para poder compararlos con los resultados del método estándar APHA 5530 Fenoles (Totales) (APHA, AWWA, WEF, 2005).

Se realizaron paralelamente análisis de material de referencia certificado y muestras de aguas tanto con el método estándar como con el método desarrollado de EFS-CLAE (Ver Tablas 4 y 5).

Como se puede observar de los resultados obtenidos, el método desarrollado presentó una mayor recuperación que el método estándar.

Las muestras de agua potable y agua superficial no presentaron fenoles detectables por los dos métodos. Las muestras de aguas residuales tuvieron

fenoles y fue posible deducir una diferencia entre la cantidad cuantificada para cada método, 0.216 mg/L con el método estándar y 0.240 mg/L con el método desarrollado; como en el caso del material de referencia certificado, el método estándar presentó una mayor recuperación.

Los resultados expuestos demuestran que el método desarrollado y validado es apto para la determinación de Fenoles por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia para el análisis de aguas residuales, superficiales y de consumo.

III CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- El método desarrollado para el análisis de compuestos fenólicos en aguas superficiales, residuales y de consumo por cromatografía líquida de alta eficiencia y extracción en fase sólida, logra el aislamiento, extracción, separación y detección de diez compuestos fenólicos individuales, prioritarios para el control de la contaminación ambiental, en un rango entre 0.001 y 0.5 mg/L.
- La técnica de extracción en fase sólida para la extracción de compuestos fenólicos de las diferentes matrices de agua, presenta una recuperación entre 94 y 99%, lo cual la hace una metodología eficiente y adecuada para la preparación de muestras para el análisis por cromatografía líquida.
- La validación del método desarrollado evidencia una adecuada precisión en los niveles estudiados, ya que se cumple el criterio Horwitz para coeficientes de variabilidad, tanto en condiciones de repetibilidad, como reproducibilidad.
- La recuperación que presenta el método, al analizar un material de referencia certificado, para los diez fenoles analizados es mayor al 94% y



en todos los casos se cumple con los valores aceptables presentados en el certificado.

- El estudio de efecto matriz realizado en agua potable, agua embotellada, agua superficial y agua residual de cuatro diferentes industrias, evidencia que el método tiene adecuada precisión y recuperación en las matrices analizadas.
- Las muestras de agua de consumo (agua potable y agua embotellada) y agua residual analizadas presentan concentraciones de compuestos fenólicos menores al límite de cuantificación del método. Las muestras cumplen con la legislación.
- Las muestras analizadas de agua residual de cuatro diferentes industrias tienen presencia de fenoles en concentraciones cuantificables con el método usado, solo en un caso los valores son superiores a los límites permisibles de la legislación.
- El método cromatográfico desarrollado presenta algunas ventajas al compararlo con el método estándar SM 5530 Fenoles (Totales). La recuperación de material de referencia y muestras es mayor; la cromatografía líquida es una técnica más sensible que la espectrofotometría UV-VIS, se disminuye considerablemente el consumo de solventes orgánicos, se elimina el uso de cloroformo, se utiliza menor cantidad de muestra, la extracción en fase sólida es más eficiente que la extracción líquido-líquido y se pueden analizar compuestos fenólicos individuales.
- Se recomienda en el uso cotidiano del método, con las siguientes medidas de control de calidad: preparación de curvas de calibración, análisis de duplicados en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, análisis de estándares de control en el rango de la curva, con cada "set" de muestras. Además es importante un plan de lectura de materiales de referencia y participación en ensayos interlaboratorios, para comprobar que el método se encuentra en control.
- El método desarrollado puede ser usado en futuros estudios sobre contaminación del recurso agua en cualquiera de las matrices contempladas en la presente investigación o en nuevas matrices que pueden ser estudiadas.
- Se recomienda en futuras investigaciones introducir el uso de estándar interno en el método cromatográfico, ya que sería un aporte a la minimización de efecto matriz en muestras desconocidas.

LITERATURA CITADA

- Empresa Metropolitana de Alcantarillado y Agua Potable Quito. (2008). *Recursos, Producción*. Obtenido de AGUA CAPTADA, PRODUCIDA Y DISTRIBUIDA: <http://www.emaapq.com.ec/>
- APHA, AWWA, WEF. (2005). *Standard Methods for Water and Wastewater Examination 21ed*. Estados Unidos.
- ATSDR. (15 de junio de 2006). *Medical Management Guidance for Phenol*. Obtenido de <http://www.atsdr.cdc.gov/MHMI/mmg115.html>
- Bloch, D. (2006). *Organic Chemistry Demystified*. (Blacklick, OH, USA: McGraw-Hill Professional Publishing). Obtenido de p.296: <http://site.ebrary.com/lib/puce/10155018&ppg=320>
- Caledra Castro, M., Santos Montes, A. M., & Izquierdo Hornillos, R. (1 de julio de 2006). *Method Development and Validation for Phenol and Nitrophenols in Tap Water by HPLC using a Monolithic Column*. (Chromatography Online). Obtenido de <http://chromatographyonline.findpharma.com/lcgc/article/articleDetail.jsp?id=358051&pageID=1&sk=&date>
- Corporación de Estudios y Publicaciones. (2007). *Legislación Ambiental. Control de Contaminación* (Vol. Tomo V). Dirección Metropolitana Ambiental. (2005). *Resolución No. 003, Capítulo III*. Quito, DM.
- Gidding, J. C. (1973). *Chemistry, Man and Environmental Change, An Integrated Approach*. New York: Canfield Press.
- INEN. (1998). Agua Purificada Envasada. Requisitos. 2 200:98. En INEN.
- INEN. (2006). *Agua Potable Requisitos. 1 108:2006*.
- NIH. (1994). *Environmental Health Criteria Vol:161*. Obtenido de <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search>
- Sarno, M., & Delfino, M. (2007). *Fenoles y Derivados por HPLC-SPE*. Obtenido de <http://www1.unne.edu.ar/cyt/2001/8-Exactas/E-042.pdf>
- Water Chromatography. (1998). *Methods for Oasis HLB Products*.
- Waters Corporation. (2002). Waters OASIS sample extraction products. *Phenols in Drinking Water*.



TABLAS

Tabla 1: Pruebas de optimización de las condiciones cromatográficas

PARÁMETRO	PRUEBAS REALIZADAS
Fase móvil	Metanol - Agua Acetonitrilo - Agua
Modificaciones de la fase móvil	Buffer de Acetato de sodio al 0,005M Acidificación al 1% con ácido acético
Gradiente	Separación isocrática Separación con diferentes gradientes
Flujo de fase móvil	1.0 mL/min 1.2 mL/min 2.0 mL/min
Volumen de inyección	10 µL 20 µL 30 µL
Temperatura de la columna	25 °C 30 °C
Longitud de onda de detección	280 nm 360 nm

Tabla 2: Condiciones optimizadas para CLAE

PARÁMETRO	CONDICIÓN OPTIMIZADA
Fase móvil	A: 1% de ácido acético en agua C: 1% de ácido acético en acetonitrilo
Gradiente	0 min: A 75 %, C 25 % 0 - 1 min: A 75 %, C 25 % 1 - 30 min: A 0 %, C 100 % 30 - 33 min: A 75 %, C 25 % 33 - 38 min: A 75 %, C 25 %
Volumen de inyección	1.2 mL/min
Temperatura de columna	25 °C
Longitud de onda de detección	280 nm



Tabla 3: Orden de elución y tiempo de retención de fenoles

Orden elución	Compuesto	Tiempo de Retención (min)	Tolerancia (min)	Rango de tiempo de Retención (min)
1	Fenol	3.650	+/- 2.5 %	3.559 - 3.741
2	4-nitrofenol	5.037	+/- 2.5 %	4.911 - 5.163
3	2-clorofenol	6.477	+/- 2.5 %	6.315 - 6.639
4	2-nitrofenol	6.987	+/- 2.5 %	6.812 - 7.162
5	2,4-dinitrofenol	7.373	+/- 2.5 %	7.189 - 7.557
6	2,4-dimetilfenol	8.357	+/- 2.5 %	8.148 - 8.566
7	4-cloro-3-metilfenol	9.473	+/- 2.5 %	9.236 - 9.710
8	4,6-dinitro-2-metilfenol	10.383	+/- 2.5 %	10.123 - 10.643
9	2,4,6-triclorofenol	12.653	+/- 2.5 %	12.337 - 12.969
10	Pentaclorofenol	16.757	+/- 2.5 %	16.338 - 17.176

**Tabla 4: Comparación entre método estándar y método desarrollado.
 Análisis de Material de referencia certificado**

Valor Certificado	Método estándar	% Recuperación desarrollado	Método	% Recuperación
1.010	0.860	85.15%	0.980	97.03%

Tabla 5: Comparación entre método estándar y método desarrollado. Análisis de Muestras

Muestra	Resultado método estándar	Resultado método desarrollado
Agua Potable	< 0.001 mg/L	< 0.001 mg/L
Agua Superficial	< 0.001 mg/L	< 0.001 mg/L
Agua Residual	0.216 mg/L	0.240 mg/L



Tabla 6: Resultados de la Validación del Método

PARÁMETRO VALIDACIÓN	RESULTADO	DESCRIPCIÓN
<i>Linealidad</i>	Rango de 0.001 mg/L a 0.5 mg/L (fenoles individuales). Rango de 0.001 mg/L a 5.0 mg/L (fenoles totales). Coeficientes de correlación para el ajuste de las curvas mayores a 0.99.	Se determinó la pendiente y la intersección de las curvas de calibración realizadas, para todos los compuestos, en un intervalo de 0.1 a 0.5 mg/L de compuestos fenólicos.
<i>Límite detección</i>	Límites de detección se encuentran entre 0.0001 y 0.0003 mg/L, según el compuesto.	Inyecciones de blancos. Límite de detección del instrumento es la media más tres desviaciones estándar de las mediciones.
<i>Límite cuantificación</i>	Límite de cuantificación 0.001 mg/L, con coeficientes de variación menores al 10%.	Se realizó la extracción en fase sólida de estándares de 0.001 mg/L, 0.005 mg/L y 0.01 mg/L.
<i>Precisión de repetibilidad y reproducibilidad</i>	Los coeficientes de variabilidad %CV encontrados son menores al 5%.	Se realizó repeticiones en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad de estándares limpios en distintos niveles de concentración.
<i>Exactitud</i>	Se obtuvieron valores de exactitud menores al 5% para todos los compuestos fenólicos.	Se analizó Material de Referencia Certificado.
<i>Efecto matriz</i>	%CV menores al 10 %, para aguas de consumo, superficiales y residuales.	Adición de estándar de concentración conocida en muestras reales.

Tabla 7: Resultados del análisis de muestras de agua mediante el método desarrollado y validado

Tipo Agua	Fuente	Resultado	Norma	Cumplimiento
Consumo	Agua Potable Planta Bellavista, sitios: Calderón, Carcelén, Cotocollao, Comité del Pueblo, La Kennedy, El Batán, Jipijapa, González Suárez, La Floresta y Alameda.	Concentraciones < 0.001mg/L.	INEN Agua Potable. Requisitos. 1 108:20011 (INEN, 2006). LMP* 2,4,6-triclorofenol es 0.2 mg/L y para pentaclorofenol es 0.009 mg/L.	Todas las muestras analizadas cumplen.
Consumo	Embotellada. 5 marcas comerciales.	Concentraciones < 0.001mg/L.	INEN Agua Purificada Envasada. Requisitos. 2 200:98 (INEN, 1998). LMP* compuestos fenólicos totales es 0.001 mg/L.	Todas las muestras analizadas cumplen.
Superficiales	Tres puntos del Río Papallacta.	Concentraciones < 0.001mg/L.	TULAS, Libro VI, Anexo 1, Tabla 3. (Corporación de Estudios y Publicaciones, 2007). LMP* clorofenoles de 0.5mg/L y fenoles monohídricos de 0.001 mg/L.	Todas las muestras analizadas cumplen.
Residuales	Industrias alimentaria, florícola, hidrocarburos y textilera.	Concentraciones < 0.001mg/L. Excepto industria hidrocarburos: 0.240 mg/L.	TULAS, Libro VI, Anexo 1, Tablas 11, 12 y 13. (Corporación de Estudios y Publicaciones, 2007). LMP* compuestos fenilícosos 0.2 mg/L.	Todas las muestras analizadas cumplen, excepto hidrocarburos.

*LMP: límite máximo permisible



FIGURAS

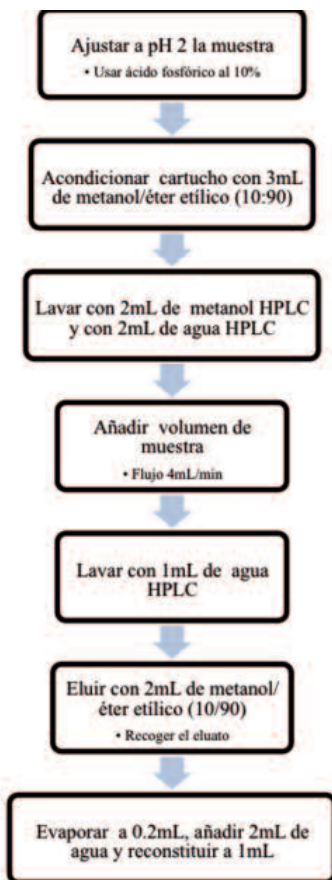


Figura 1: Diagrama extracción en fase sólida método modificado

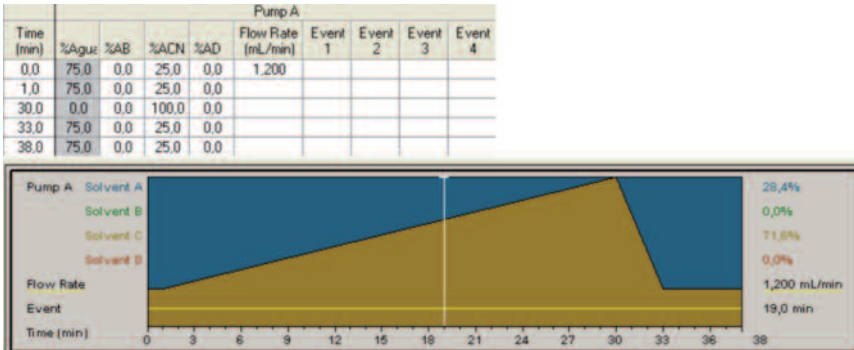


Figura 2: Método Cromatográfico Optimizado

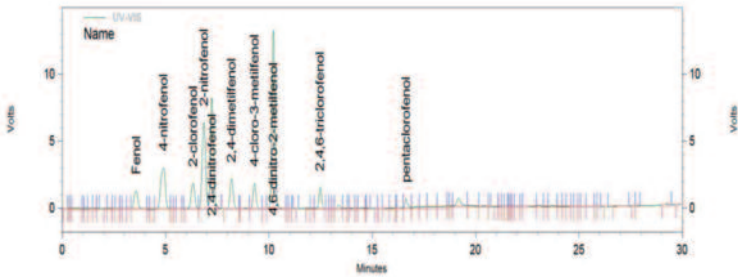


Figura 3: Cromatograma de orden de elución de compuestos fenólicos

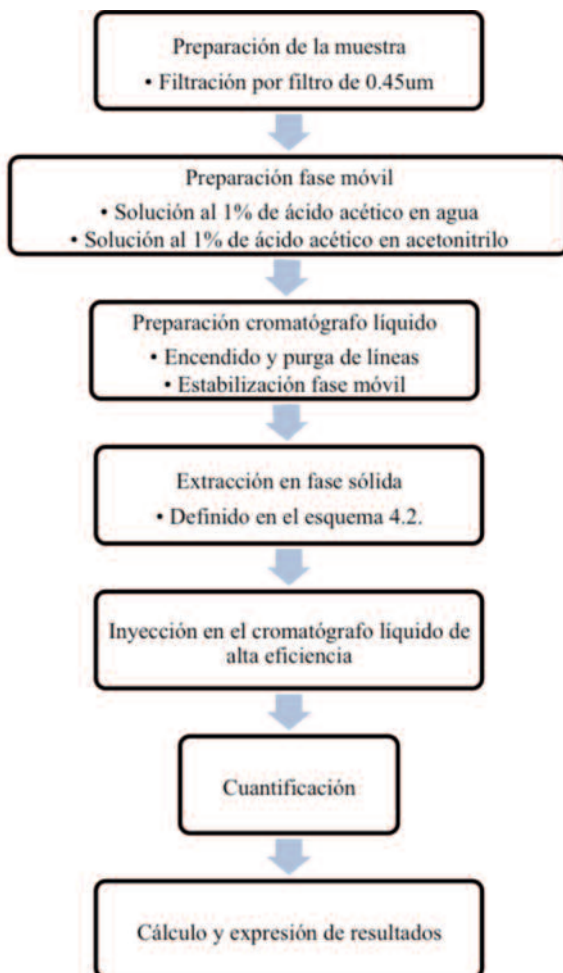


Figura 4: Esquema del procedimiento para determinación de fenoles por CLAE

**CARACTERIZACIÓN DEL
MECANISMO DE LA REACCIÓN
ENTRE N-HEXENO Y METANAL
A TRAVÉS DE LOS CONCEPTOS DE
FUERZA DE REACCIÓN, CONSTANTE
DE FUERZA Y FLUJO ELECTRÓNICO
DE REACCIÓN**

**MECHANISM CHARACTERIZATION OF THE
REACTION BETWEEN N-HEXENE AND
METHANAL THROUGH REACTION FORCE,
REACTION FORCE CONSTANT AND REACTION
ELECTRONIC FLUX CONCEPTS**

**PAMELA CARRILLO S.
LORENA MENESES O.**

*Recibido 26 de marzo de 2012
Aceptado 9 de abril de 2012*



CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE LA REACCIÓN ENTRE N-HEXENO Y METANAL A TRAVÉS DE LOS CONCEPTOS DE FUERZA DE REACCIÓN, CONSTANTE DE FUERZA Y FLUJO ELECTRÓNICO DE REACCIÓN

Pamela Carrillo S.¹, Lorena Meneses O.¹

PALABRAS CLAVES: Reacción Alder-eno, fuerza de reacción, constante de fuerza, flujo electrónico

KEY WORDS: Alder-ene reaction, reaction force, force constant, electronic flux

RESUMEN

Mediante los conceptos de fuerza de reacción, constante de fuerza y perfil de flujo electrónico de reacción se caracterizó el mecanismo de reacción entre n-hexeno y metanal. Termodinámicamente, es una reacción exotérmica ($\Delta E^\circ = -13.6$ kcal/mol) con una energía de activación de 34.2 kcal/mol. En el

mecanismo, se distinguen tres pasos importantes, que inician con el desplazamiento del hidrógeno desde el n-hexeno al metanal, a continuación se produce el reordenamiento electrónico tanto de electrones π como σ y termina con una relajación estructural y formación de enlaces σ , para dar finalmente un producto de transferencia de grupo.

² Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Escuela de Ciencias Químicas, Quito Ecuador, (lmmeneses@puce.edu.ec).

ABSTRACT

The reaction mechanism between n-hexene and methanal was characterized through the concepts of reaction force, force constant and electronic flux. It is an exothermic reaction ($\Delta E^\circ = -13.6$ kcal/mol) with an activation energy of 34.2 kcal/mol. The mecha-

nism consists of three important reaction steps, which begin with the hydrogen displacement from n-hexene to methanal, followed by electronic rearrangement of π and σ electrons, and ending with structural relaxation. Finally, σ bonds are produced, to yield a group transfer product.

INTRODUCCIÓN

En 1928, los alemanes Otto Diels y Kurt Alder desarrollaron una de las más versátiles reacciones sintéticas: la reacción Diels-Alder. Esta reacción es utilizada para la producción de diversos compuestos como morfina, colesterol y cortisona (Solomons & Fryhle, 2007).

Su variación, la reacción conocida como reacción Alder-eno se produce entre el hidrógeno alílico de un alqueno (eno) y un compuesto con un enlace múltiple (enófilo). En la Figura 1 está representado este tipo de reacción.

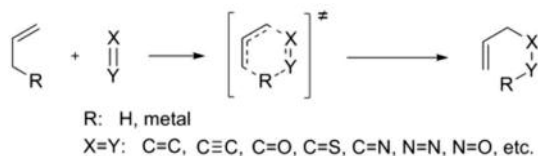


Figura 1: Representación general de la reacción Alder-eno entre un alqueno y un compuesto de enlace múltiple, donde el enlace X=Y puede ser carbono-carbono, carbono-oxígeno, carbono-azufre, carbono-nitrógeno, nitrógeno-nitrógeno, nitrógeno-oxígeno, etc.

La reacción es pericíclica, ya que se caracteriza por tener un estado de transición cíclico, donde se produce un reordenamiento de los electrones para la formación del producto. Es un sistema de cuatro electrones donde el

doble enlace se relocaliza y forma nuevos enlaces σ . En general, requiere de altas temperaturas, sustratos altamente activados o un ácido Lewis como catalizador, debido a la alta energía de activación y el requerimiento es-



térico-electrónico que necesita la ruptura del enlace σ del C-H. Varios estudios teóricos y computacionales se han realizado sobre la naturaleza del estado de transición (Deng *et al.*, 1997; Loncharich & Houk, 1987; Stephenson *et al.*, 1980; Yamaguchi *et al.*, 1978), sin embargo, el mecanismo de reacción solo ha sido caracterizado por medio de la interacción de los orbitales de frontera de los reactivos (Inagaki *et al.*, 1976).

Con la introducción de descriptores cuánticos como los perfiles energéticos, la fuerza de reacción, la constante de fuerza y el flujo electrónico de reacción, se pueden caracterizar de manera detallada los mecanismos de reacción. Los perfiles de energía describen el cambio de energía potencial a lo largo del curso de una reacción química (coordenada de reacción). Este perfil permite obtener información sobre la termodinámica (entalpías) y la cinética (energía de activación) de las reacciones. Se reconocen tres regiones a lo largo de la coordenada de reacción: la de los reactivos, la del estado de transición y la de los productos.

La fuerza de reacción es el negativo de la derivada de la energía potencial con respecto a la coordenada de reacción (ξ). La constante de fuerza de reacción, resulta al derivar negativamente la fuerza de reacción. Juntos proveen de información sobre el mecanismo de reacción.

Por su parte, el potencial químico y el flujo electrónico de reacción describen el proceso de transferencia electrónica. El flujo electrónico de reacción se deriva del potencial químico cuando se considera el cambio del gradiente de la densidad de carga entre dos puntos de la reacción.

Para la caracterización del mecanismo de la reacción Alder-eno se tomó como ejemplo la reacción entre n-hexeno y metanal, para producir 3-hepten-1-ol, mediante la aplicación de los descriptores antes mencionados. La reacción se ilustra en la Figura 2.

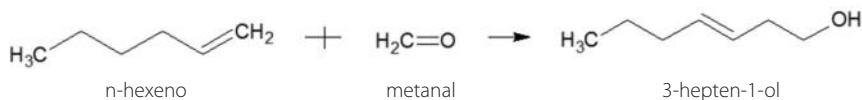


Figura 2: Reacción Alder-eno entre n-hexeno y metanal



I OBJETIVOS

Caracterizar el mecanismo de reacción entre n-hexeno y metanal mediante los conceptos de fuerza de reacción, constante de fuerza de reacción y flujo electrónico de reacción.

Utilizar métodos computacionales enmarcados dentro de la Teoría del

Funcional de la Densidad (DFT) para caracterizar el mecanismo de la reacción entre n-hexeno y metanal.

Reconocer los principales cambios estructurales y electrónicos que se producen en el transcurso de la reacción entre n-hexeno y metanal.

II MARCO TEÓRICO

Perfiles de energía y fuerza de reacción

Los perfiles de energía son diagramas bidimensionales que relacionan la energía potencial de cada punto de la reacción desde que se produce la colisión entre reactivos, luego de pasar por un estado de transición, y finalmente, la formación de productos. Produce información sobre la termodinámica de reacción como la obtención de las energías de reacción (entalpías), y también sobre la cinética de reacción a través de las energías de activación. La coordenada intrínseca de reacción ($IRC=\xi$) (Fukui, 1981), describe el camino que recorre la evolución de una reacción química al relacionar la energía potencial (E) de reactivos y productos conectados a través de un estado de transición.

Al diferenciar numéricamente $E(\xi)$ da como resultado la fuerza de reacción, $F(\xi)$ (Toro-Labbé, 1999; Jaque *et al.*, 2000; Gutiérrez-Oliva *et al.*, 2005; Toro-Labbé *et al.*, 2004; Martínez & Toro-Labbé, 2004; Politzer *et al.*, 2005; Jaque *et al.*, 2008; Flores-Morales *et al.*, 2010), (Ec. 1) que proporciona información importante sobre el mecanismo de un proceso químico.

$$F(\xi) = - \frac{dE}{d\xi} \quad (1)$$

Se pueden distinguir tres regiones importantes entre dos puntos críticos de $F(\xi)$ separados por una barrera energética: un mínimo (ξ_1) y un máximo (ξ_2). Estos definen las regiones de reacción: región de reactivos

$$(\xi_R \leq \xi \leq \xi_1),$$

región del estado de transición



$$(\xi_1 \leq \xi \leq \xi_2)$$

y la región de productos ($\xi_2 \leq \xi \leq \xi_p$), donde ξ_R y ξ_P corresponden a las energías de reactivos y productos, respectivamente. En la región de reactivos, estos se preparan para reaccionar a través de cambios estructurales; en la del estado de transición se da el reordenamiento electrónico; y en la de productos, se da la relajación estructural hasta alcanzar la conformación de los productos.

Constante de Fuerza

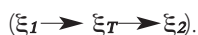
Otro concepto derivado es la constante de fuerza de reacción $\kappa(\xi)$, que está definida como la derivada negativa de la Fuerza de reacción $F(\xi)$ con respecto a la coordenada intrínseca de reacción

$$\kappa(\xi) = -\frac{\delta F(\xi)}{\delta \xi} \quad (2)$$

El perfil de la constante de fuerza de reacción es positiva en las regiones de los productos y reactivos



y negativo en la del estado de transición



En el máximo y en el mínimo de $F(\xi)$, ξ_1 y ξ_2 , es cero, por lo cual da como resultado un máximo y un mínimo en los puntos de inflexión de $F(\xi)$ (Jaque *et al.*, 2008).

Potencial químico y flujo electrónico de reacción

El potencial químico (Parr & Yang, 1989) es la medida de la tendencia que poseen los electrones de escapar de un sistema. Así, se define mediante la Ecuación 3 que corresponde a la de Milliken para la electronegatividad pero con signo contrario, donde A es la afinidad electrónica e I el potencial de ionización del sistema.

$$\mu = -\frac{A+I}{2} = -X_M \quad (3)$$

Al aplicar la aproximación de Koppmans' da como resultado:

$$-\mu = X_M = \frac{A+I}{2} = \frac{\epsilon_{HOMO} + \epsilon_{MUMO}}{2} \quad (4)$$

Donde ϵ_{HOMO} y ϵ_{MUMO} son las energías de los orbitales moleculares de frontera HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) y LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital). Al evaluar μ a lo largo de la coordenada de reacción se determina el perfil $\mu(\xi)$, que permite medir el flujo electrónico entre moléculas con diferentes valores de μ . Por lo cual se puede establecer el flujo electrónico de reacción $J(\xi)$ como (Herrera & Toro-Labbé, 2007; Vogt-Geisse & Toro-Labbé, 2009):

$$J(\xi) = -Q \frac{\delta\mu}{\delta\xi} \quad (5)$$

Donde Q es el coeficiente de transporte, que para este caso, se lo tomará como Q=1. Al analizar termodiná-

micamente el flujo electrónico, se puede diferenciar regiones $J(\xi) < 0$ que son relacionadas con cambios espontáneos de la densidad electrónica y regiones $J(\xi) > 0$, asociadas con cambios no espontáneos en la densidad electrónica.

III MÉTODOS Y DETALLES COMPUTACIONALES

Para la caracterización de la reacción Alder-eno entre n-hexeno y metanal, se optimizaron las estructuras de reactivos, producto y estado de transición. Para el efecto, se usó un método híbrido funcional derivado de la DFT: B3LYP, y la base 6-311G(d,p). Para el caso del estado de transición se usó del keyword TS, además del cálculo de constantes de fuerza con el keyword CALCFC y el cálculo de frecuencias con el keyword FREQ. Para asegurar que se ha encontrado un estado de transición, se debe observar la presencia de una frecuencia imaginaria. Se utilizaron el mismo método y base para la dilucidación

de la coordenada intrínseca de reacción y la determinación del perfil energético, mediante el uso del keyword: IRC. Se realizaron análisis energéticos (single point) de cada estructura optimizada a lo largo del IRC, con el método Hartree-Fock (HF) y el conjunto de bases 6-31G(d), para el cálculo de la fuerza de reacción, los potenciales químicos y el flujo electrónico de reacción. Para la obtención de estos descriptores se utilizaron las Ecuaciones 1 a 5. Todos los cálculos fueron realizados con el paquete *Gaussian 03*. Para la visualización de las geometrías de las estructuras se utilizó el programa GaussView 4.1.

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 3 se encuentra representada la reacción entre n-hexeno y metanal, donde se observan las estructuras de los reactivos, estado de transición y producto. Se puede visua-

lizar y constatar que se produce un estado de transición cíclico. El hidrógeno alílico de 9C se adiciona a 20O del metanal, mientras se produce una relocalización del enlace π de 5C-6C a 6C-7C.

Además se produce la formación de un enlace σ entre 1C y 5C y se obtiene como resultado un producto de trans-

ferencia de grupo donde se forman dos enlaces σ a expensas de un enlace π .

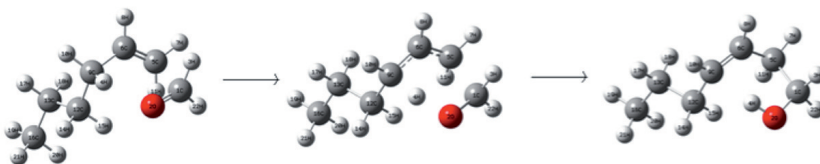


Figura 3. Modelo de bolas para la reacción esquemática entre n-hexeno y metanal, donde se representa en gris los átomos de carbono, en blanco los átomos de hidrógeno y en rojo los átomos de oxígeno. Cada átomo está numerado para visualizar los cambios estructurales

El perfil energético de la reacción (Figura 4) indica que es una reacción exotérmica ($\Delta E^{\circ} = -13.6$ kcal/mol), con una energía de activación de 34.2 kcal/mol. Al comparar los resultados termodinámicos obtenidos en este estudio con datos obtenidos de la literatura, se puede observar que las reacciones Alder-eno son reacciones exotérmicas, que liberan energía en forma de calor, ya que la energía de reacción entre etileno y propeno realizadas con un método MP2 y conjunto de bases 6-31g(d) fue de $\Delta E^{\circ} = -29.4$ kcal/mol (Deng *et al.*, 1997). Además, al relacionar las energías de activación entre la reacción de propeno y etileno de 35 kcal/mol y entre propeno y metanal de 30 kcal/mol (Deng *et al.*, 1997), se observa que se encuentra dentro del rango de energía de activación encontrado para la reacción

en estudio. La diferencia de la misma se debe a las diferencias estructurales y largo de las cadenas de carbono tanto de reactivos como de productos. Adicionalmente, al comparar la reacción bajo estudio con una reacción Diels-Alder entre 1,3-butadieno y etileno en la cual la energía de activación es de 25.4 kcal/mol (Bach *et al.*, 1989), se confirma que las energías de activación de las reacciones Alder-eno son mayores a las Diels-Alder. En las reacciones Diels-Alder participan 6 electrones π , mientras que en la reacción Alder-eno participan 4 electrones π y 2 σ , por lo cual se requiere mayor energía para alcanzar el estado de transición (Singh, 2005).

Como se puede observar, el perfil energético nos proporciona información sobre la termodinámica de la

reacción. Sobre la cinética de la reacción nos proporciona únicamente la estructura del estado de transición y la energía de activación. Sin embargo, no ofrece ninguna información respecto del mecanismo de la reacción, es decir,

que cambios estructurales o electrónicos se llevan a cabo para que los reactivos se transformen en productos. Estos aspectos pueden ser analizados por medio de los descriptores definidos.

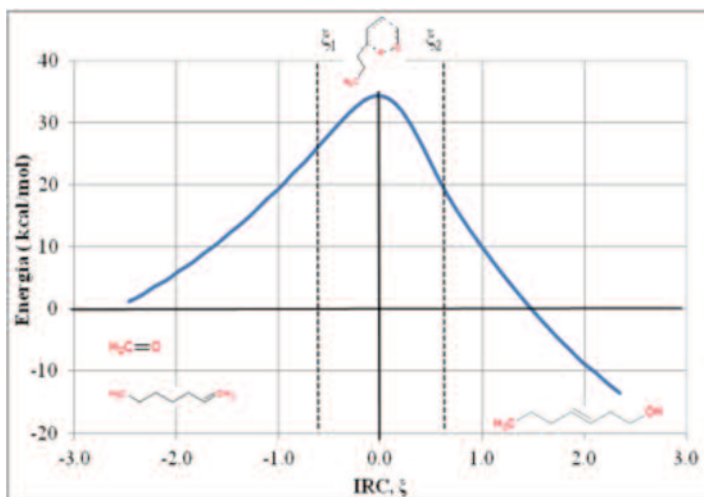


Figura 4: Perfil energético, $E(\xi)$, para la reacción n-hexeno- metanal. En el extremo izquierdo está representada la energía de los reactivos. La energía aumenta hasta alcanzar un máximo en la estructura del estado de transición (Energía de activación), para luego decrecer hasta alcanzar la estructura del producto en el extremo derecho

En el perfil de fuerza de reacción, $F(\xi)$, (Figura 5) se pueden diferenciar tres regiones importantes, separadas por el mínimo (ξ_1) y el máximo (ξ_2) indicados por una línea entrecortada. En la región de los reactivos ($\xi_R \leq \xi \leq \xi_1$) se producen principalmente los despla-

zamientos asociados a la transferencia del hidrógeno. A continuación, se identifica la región del estado de transición ($\xi_1 \leq \xi \leq \xi_2$), donde se da el reordenamiento electrónico. En esta región se puede ver la formación de enlaces resonantes debido a la relocalización de



los electrones. Aquí, se da la interacción del átomo de hidrógeno con el orbital HOMO del n-hexeno y el LUMO del metanal. Por último, se distingue la región de los productos ($\xi_2 \leq \xi \leq \xi_p$), donde se da la relajación de los átomos donadores y aceptores de electrones, para la for-

mación del producto, produciéndose fundamentalmente el enlace σ entre los carbonos del metanal y el hexeno. La reacción Alder-eno comprende un solo paso elemental, por lo cual se distinguen solo estas tres regiones.

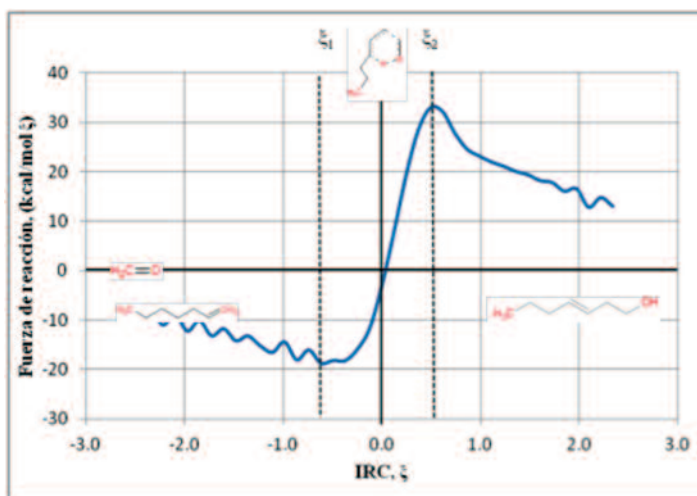


Figura 5: Perfil de fuerza de reacción, $F(\xi)$, para la reacción n-hexeno-metanal.

En el extremo izquierdo está representada la fuerza de reacción de los reactivos.

La fuerza de reacción decrece hasta un mínimo en ξ_1 , pasa por cero en la estructura del estado de transición hasta alcanzar un máximo en ξ_2 , para luego volver a decrecer en la estructura del producto

Al analizar el perfil de la constante de fuerza de reacción (Figura 6), se puede observar que en la región donde es negativa, coincide con la región entre el máximo y mínimo del perfil de fuerza de reacción ($\xi_1 \leq \xi \leq \xi_2$). Se

confirma que la reacción no posee un punto único de estado de transición, sino tiene una región de transición donde el sistema pasa de reactivos activados hacia productos activados (Toro-Labbé *et al.*, 2009). Adicional-

mente, se observa que la región del estado de transición posee una gradiente de energía igual a cero para todos los grados de libertad con una constante de fuerza negativa (Jaque *et al.*, 2008),

lo cual confirma que el estado de transición no solo corresponde a un punto de la coordenada intrínseca de reacción, sino a una región a lo largo de la coordenada intrínseca de reacción.

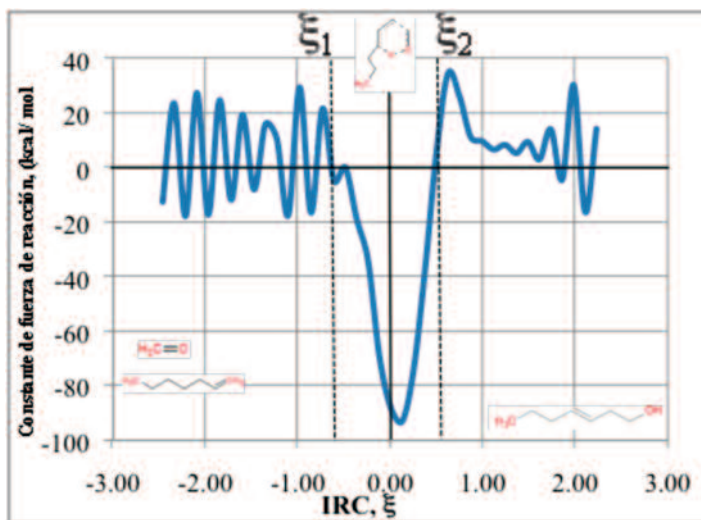


Figura 6: Perfil de constante de fuerza, $\kappa(\xi)$, para la reacción n-hexeno-metanal. La constante de fuerza es aproximadamente cero en la región de los reactivos y del producto, pero decrece radicalmente hasta un mínimo en la región del estado de transición

La Figura 7 muestra la evolución del flujo electrónico, $J(\xi)$, a lo largo de la coordenada intrínseca de reacción. Así, se observa que tanto en el área de reactivos ($\xi_R \leq \xi \leq \xi_I$) como de productos ($\xi_2 \leq \xi \leq \xi_P$), existe una tendencia a cero del flujo electrónico de reacción,

caracterizándolas como regiones de equilibrio. En estas regiones el flujo electrónico en direcciones opuestas, está completamente balanceado, siendo zonas donde se da, esencialmente, el reordenamiento estructural. Por el contrario, la región del estado de tran-



sición se diferencia por una dramática caída del flujo electrónico desde los reactivos, que adoptan un mínimo cerca de la región donde se produce la estructura del estado de transición, para nuevamente aumentar al acercarse a la zona de productos. Lo mismo corro-

bor la información obtenida del perfil de fuerza de reacción que en la zona del estado de transición ($\xi_1 \leq \xi \leq \xi_2$) se da el reordenamiento electrónico de los electrones π del n-hexeno y el metanal y los electrones σ del enlace C-H libre del n-hexeno.

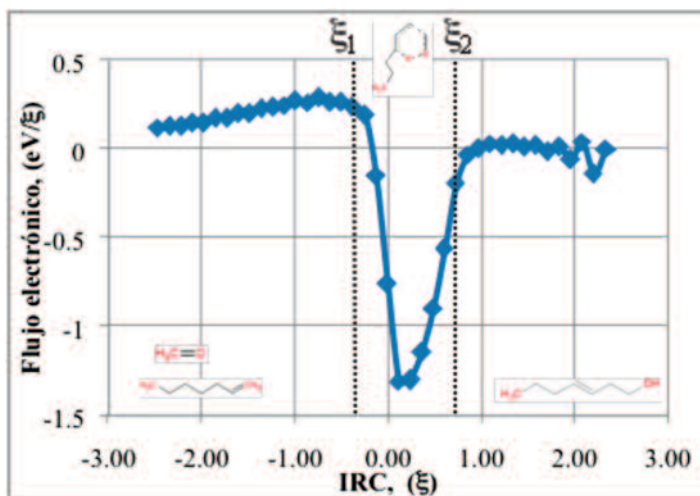


Figura 7: Flujo electrónico de reacción, $J_{\mu}(\xi)$, para la reacción entre n-hexeno y metanal. El flujo electrónico de reacción es aproximadamente cero en la región de los reactivos y del producto, pero decrece hasta un mínimo en la región del estado de transición

IV CONCLUSIÓN

La reacción Alder-eno entre n-hexeno y metanal, que consta de un solo paso elemental, ha sido caracterizada por medio de la aplicación de descriptores cuánticos como los conceptos

de fuerza de reacción, constante de fuerza de reacción y flujo electrónico de reacción. Se ha determinado que es una reacción exotérmica que posee una energía de activación mayor a re-

acciones Diels-Alder similares. Adicionalmente, se describió su mecanismo de reacción a lo largo de la coordenada intrínseca de reacción, diferenciándose tres regiones: la de los reactivos ($\xi_R \leq \xi \leq \xi_1$), la del estado de transición ($\xi_1 \leq \xi \leq \xi_2$) y la de los productos ($\xi_2 \leq \xi \leq \xi_P$). Al analizar los perfiles de fuerza de reacción, constante de fuerza de reacción

y flujo electrónico de reacción, se observa que en la región de los reactivos se produce el desplazamiento del hidrógeno alílico, en la región del estado de transición ocurre el reordenamiento electrónico; y, por último, en la región de los productos, se observa una relajación estructural acompañada de la formación de enlaces σ .



LITERATURA CONSULTADA

- Bach, R.D., McDouall, J. J. W., Schlegel, H. B., (1989). Electronic Factors Influencing the Activation Barrier of the Diels-Alder Reaction. An Ab Initio Study, *Journal of Organic Chemistry*, 54, 2931-2935.
- Deng, Q., Bert E. Thomas IV, Houk N K., Dowd P., (1997). Transition Structures of the Ene Reactions of Cyclopropene, *Journal of the American Chemical Society*, 119 (29), 6902-6908.
- Flores-Morales, P., Gutiérrez-Oliva, S., Silva, E., Toro-Labbé, A., (2010). The reaction electronic flux: A new descriptor of the electronic activity taking place during a chemical reaction. Application to the characterization of the mechanism of the Schiff's base formation in the Maillard reaction, *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 943, 121-126.
- Fukui, K., (1981). The Path of Chemical Reactions-The IRC Approach, *Accounts of Chemical Research*, 14 (12), 363-368.
- Graham Solomons, T. W. & Fryhle, C. B., (2007). *Organic Chemistry*. (9a. ed.), New York, Estados Unidos.
- Gutiérrez-Oliva, S., Herrera, B., Toro-Labbé, A., Chermette, H., (2005). On the Mechanism of Hydrogen Transfer in the HSCH(O) (S)CHOH and HSNO SNOH Reactions, *Journal of Physical Chemistry A*, 109 (8), 1748-1751.
- Herrera, B., Toro-Labbé, A., (2007). The Role of Reaction Force and Chemical Potential in Characterizing the Mechanism of Double Proton Transfer in the Adenine-Uracil Complex, *Journal of Physical Chemistry*, 111, 5921-5926.
- Inagaki, S., Fujimoto, H., Fukui, K., (1976). Orbital interaction in three systems, *Journal of the American Chemical Society*, 98 (16), 4693-4701.
- Jaque, P., Toro-Labbé, A., (2000). Theoretical Study of the Double Proton Transfer in the CHX-XH...CHX-XH (X = O, S) Complexes, *Journal of Physical Chemistry A*, 104 (5), 995-1003.
- Jaque, P., Toro-Labbé, A., Politzer, P., Geerlings, P., (2008). Reaction force constant and projected force constants of vibrational modes along the path of an intramolecular proton transfer reaction, *Chemical Physics Letters*, 456, 135-140.
- Loncharich, R. J., Houk K. N., (1987). Transition structures of ene reactions of ethylene and formaldehyde with propene, *Journal of the American Chemical Society*, 109 (23), 6947-6952.
- Martínez, J., Toro-Labbé, A., (2004). Energy and chemical force profiles from the Marcus equation, *Chemical Physics Letters*, 392 (1-3), 132-139.
- Parr, R. G., Yang, W., (1989). *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules*, New York, Estados Unidos [s.n]

Politzer, P., Toro-Labbé, A., Gutiérrez-Oliva, S., Herrera, B., Jaque, Mónica C. Concha, and Jane S. Murray. (2005). The Reaction Force; Three Key Points Along An Intrinsic Reaction Coordinate. *Journal of Chemical Science*, 117, 467-472.

Singh, J., (2005). *Photochemistry And Pericyclic Reactions*. (2a. ed.). New Delhi, India. [s.n]

Stephenson, L. M., Grdina, M.J., Orfanopoulos, M., (1980). Mechanism of the ene reaction between singlet oxygen and olefins, *Accounts of Chemical Research*, 13 (11), 419-425.

Toro-Labbé, A., (1999). Characterization of Chemical Reactions from the Profiles of Energy, Chemical Potential, and Hardness, *Journal of Physical Chemistry A*, 103 (22), 4398-4403.

Toro-Labbé, A., Gutiérrez-Oliva, S., Concha, M., Murray, J. S., Politzer, P., (2004). Analysis of two intramolecular proton transfer processes in terms of the reaction force, *Journal of Chemical Physics*, 121, 4570-4776.

Toro-Labbé, A., Gutiérrez-Oliva, S., Concha, M., Murray, J. S., Politzer, (2009). The Reaction Force and the Transition Region of a Reaction, *Journal of Molecular Modeling*, 15(6), 707-710.

Vogt-Geisse, S., Toro-Labbé, A., (2009). The mechanism of the interstellar isomerization reaction $\text{HOC}^+ \rightarrow \text{HCO}^+$ catalyzed by H_2 : New insights from the reaction electronic flux, *The Journal of Chemical Physics*, 130, 244308-244314.

Yamaguchi, K., Takahara, Y., Fueno, T., Houk K. N., (1978). Extended Hatree-Fock (EHF) theory of chemical reactions, *Theoretical Chemistry Accounts: Theory, Computation, and Modeling*, 73 (5-6), 337-364.

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN
MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN
DE HIDROCARBUROS TOTALES DE
PETRÓLEO (TPH'S) MEDIANTE
ESPECTROFOTOMETRÍA DE
INFRARROJOS CON TRANSFORMADAS
DE FOURIER, EN SUELOS
FORTIFICADOS**

**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A
METHOD FOR THE DETERMINATION OF TOTAL
PETROLEUM HYDROCARBONS (TPH'S) BY
INFRARED SPECTROPHOTOMETRY WITH
FOURIER TRANSFORMS IN FORTIFIED SOILS**

**DAVID ROMERO E.
WENDY HEREDIA R.**

Recibido 26 de marzo de 2012

Aceptado 9 de abril de 2012



DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO (TPH'S) MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA DE INFRARROJOS CON TRANSFORMADAS DE FOURIER, EN SUELOS FORTIFICADOS

David Romero E.¹, Wendy Heredia R.¹

PALABRAS CLAVES: TPH's, hidrocarburos totales de petróleo, espectrofotometría de infrarrojos, extracción sólido-líquido, suelo, fortificaciones

KEY WORDS: TPH's, total petroleum hydrocarbons, infrared spectrophotometry, solid-liquid extraction, soil, fortifications

RESUMEN

En este trabajo se desarrolla y valida un método para la extracción y análisis de hidrocarburos totales de petróleo en suelos, utilizando la extracción sólido-líquido mediante agitación con ultrasonido y una limpieza (clean up) con sílica gel, cuantificando por espectrofotometría de infrarrojos con transforma-

das de Fourier. Una vez declarado el método como validado se lo utiliza para determinar hidrocarburos totales de petróleo, en muestras de suelos y aguas de percolación que han sido sometidas en el laboratorio a un proceso de simulación de un derrame de petróleo.

En el proceso de validación se evalúa la exactitud, precisión, sensibili-

¹ Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Centro de Servicios Ambientales y Químicos, Quito, Ecuador (dromero@puce.edu.ec) (wherediar@puce.edu.ec).

dad y eficacia del método analítico desarrollado, obteniéndose como resultados: una exactitud de 94 %, coeficientes de variación para la precisión de repetibilidad de 9.92 % y para la precisión de reproducibilidad de 9.49 %; un límite de cuantificación de 100 mg/Kg. El rango de trabajo del método es de 100 a 5000 mg/Kg con coeficientes de correlación lineal mayores a 0.999.

Para el proceso de simulación de un derrame de crudo, se tomaron como referencia dos estudios realizados en *Agriculture Journals* (Kumar, 2006) (Gosh, 2007), así se colocó suelos del orden de Inceptisoles, suborden Andepts del gran grupo Hidrandepts, en sistemas de columnas verticales, luego se realizó una remoción física del crudo derramado y se realizó la simulación de precipitaciones durante un período comprendido de cuatro semanas. Así, se comprueba la presencia de TPH's en suelo, concentraciones entre aproximadamente 500 y 4500 mg/Kg y en agua de percolación en concentraciones de 0.4 a 0.7 mg/L; lo cual indica que un suelo de tipo Inceptisol que ha sido sometido a un derrame de petróleo, con el tiempo y con el efecto de las precipitaciones, los TPH's pueden llegar a contaminar las aguas subterráneas.

El presente trabajo se realizó en

el Centro de Servicios Ambientales y Químicos de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (CESAQ-PUCE).

ABSTRACT

This work researches and validates a method for extraction and analysis of total petroleum hydrocarbons in soil using solid-liquid extraction with ultrasonic agitation and a clean up with silica gel, quantifying by infrared spectro- photometry with Fourier transformed. When the method is validated, it is used to determine the total petroleum hydrocarbons in samples of soil and percolation water, which have been subjected to a laboratory simulation of a process oil spill.

In the validation process were evaluated the accuracy, precision, sensitivity and efficiency of the analytical method developed, yielding the following results: an accuracy of 94%, coefficients of variation for the precision of 9.92% repeatability and reproducibility of 9.49%, the recoveries of standard additions between 93.74% and 104.71%. The working range of the method goes between 100 to 5000 mg/Kg with linear correlation coefficients upper 0.999.

For the simulation process of an oil spill, was taken as reference two



studies in Agriculture Journals (Kumar, 2006) (Ghosh, 2007), which was placed on soils of the order of Inceptisoles, sub-major group Andepts Hidrandepts in vertical columns systems, followed for physical removal of oil spilled and performed the simulation of rainfall during a period of four weeks. It verifies the presence of TPH's in soil, in concentrations between about 500 and 4500

mg/kg and concentrations in percolation water between 0.4 to 0.7 mg/L, which indicates that the Inceptisol soil used when it has been subjected to an oil spill over time and with the effect of precipitation, TPH's can contaminate groundwater. This work was performed at the Centro de Servicios Ambientales y Químicos de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (CESAQ-PUCE).

INTRODUCCIÓN

El petróleo es un líquido natural oleaginoso e inflamable, constituido por una mezcla compleja de hidrocarburos que se extrae de lechos geológicos continentales o marítimos. Estos hidrocarburos están formados por átomos de carbono (85 a 90 %) e hidrógeno (10 a 14 %), junto a otros elementos como: nitrógeno, azufre, oxígeno y metales, especialmente vanadio y níquel.

El petróleo es una de las principales fuentes de energía utilizada en casi todos los procesos industriales, domésticos y de transporte; por este motivo, la industria hidrocarburífera es una de las más importantes a nivel mundial; circunstancia que crea la necesidad de establecer controles en todos los procesos relacionados con esta industria, con la finalidad de evitar cualquier daño ambiental.

Dada la importancia que en nuestros días, se da a la preservación del ambiente, es necesario, contar con un marco legal que permita llevar a cabo el control de los contaminantes en los sistemas acuáticos y edáficos.

En el Ecuador existen normas ambientales generales para todos los contaminantes, pero dada la importancia de los hidrocarburos, existe un apartado especial en el cual se trata a los contaminantes relacionados con el petróleo; este es el Decreto 1215, vigente desde el año 2001, en donde se presentan los límites máximos permisibles de los TPH's en suelos, los cuales son: 1000 mg/kg para protección de ecosistemas sensibles, 2500 mg/kg para usos agrícolas y 4000 mg/kg para usos industriales (Decreto 1215, 2001).

La contaminación de ambiente por los hidrocarburos puede darse por derrames directos de petróleo en el suelo o en el agua; infiltraciones de combustibles o aceites; fugas de combustibles por fallas en instalaciones subterráneas. También durante otros procesos de la industria hidrocarbúrfica como son la explotación, la extracción y el transporte de petróleo se pueden producir accidentes que ocasionan contaminación de suelos y aguas superficiales (Fernández *et al.*, 2006). En los suelos, la contaminación es crítica porque no solamente afecta a la flora y fauna aledañas, sino que también puede afectar a fuentes de agua cercanas o deteriorarlas y dejarlas inertes.

La contaminación por TPH's se ve influenciada por la afinidad que tienen estos contaminantes, con los compuestos de similar condición, no polares, como es el caso de la materia orgánica de suelo y la fracción arcilla, lo cual permite que los TPH's participen en fenómenos superficiales de adsorción en los coloides del suelo. Otros factores que influyen en los procesos de movilidad de los TPH's, a través del suelo son el contenido de agua o humedad, el tamaño de partícula del suelo, el contenido de la fracción arcilla y de la materia

orgánica de suelo.

También, los TPH's presentan la propiedad física de ser poco solubles en sistemas acuosos, lo cual resulta perjudicial para la vida acuática y subacuática. Así, ciertas fracciones de los hidrocarburos con una densidad menor a la del agua, forman una capa e impiden que la luz pase al medio. Además esta propiedad física constituye un factor importante a considerar al momento del desarrollo de un método analítico que permita su cuantificación.

Los TPH's están formados por los BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno), n-hexano, aceites combustibles y con base mineral, aceites minerales; estos han sido estudiados por la ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry)², la cual ha creado una serie de perfiles toxicológicos de los componentes individuales y los productos derivados del petróleo.

En el campo de la química analítica existen diferentes métodos para la extracción y cuantificación de los TPH's para distintas matrices ambientales. Así, para el proceso de extracción se encuentran algunos métodos adaptados de la obtención de aceites y gra-

² Toxicological profile for Total petroleum hydrocarbons (TPH), (1999), www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp123.pdf



sas, EPA³ 1664. Entre las técnicas de extracción se encuentran: soxhlet, microondas, solvente presurizado (PSE) y por agitación, métodos EPA 3550 y 3580. Para el proceso de cuantificación de TPH's, se encuentran métodos como: espectrofotometría de infrarrojos, la cromatografía de gases que aunque es una técnica de separación, permite también la cuantificación mediante sus detectores de ionización de llama (FID) o acoplado a espectrometría de masas (MS); entre otros (Atlantic RCBA, 2006), (Criteria Working Group, 1998).

Es así como, el objetivo general de este trabajo es desarrollar un método analítico para la determinación de TPH's, con la utilización de la técnica de extracción por agitación en baño de ultrasonido optimizada, cuantificarlos mediante la técnica de espectrofotometría de infrarrojos con transformadas de Fourier y aplicar el método analítico desarrollado y validado en suelos del orden de Inseptisoles, suborden Andepts del gran grupo Hidrandepts que han sido sometidos a una simulación

controlada del derrame de petróleo. Se propone optimizar tanto las condiciones de extracción mediante agitación por baño ultrasonido de los TPH's en suelos y el proceso de "clean up" con sílica gel, como las condiciones de cuantificación de los TPH's, y la técnica de espectrofotometría de infrarrojos con transformadas de Fourier.

Luego, validar el método de extracción y cuantificación para el análisis de TPH's, en el rango de trabajo de 100 a 5000 mg/Kg, con un coeficiente de correlación lineal de 0.99 para las curvas de calibración, coeficientes de variación de repetibilidad y reproducibilidad menores al 10% y una exactitud de $100 \pm 10\%$.

Y finalmente, determinar los TPH's en suelos del orden de Inseptisoles, suborden Andepts del gran grupo Hidrandepts y aguas de percolación obtenidas de la simulación en sistemas de columnas verticales de un derrame de crudo y posteriores precipitaciones durante un período comprendido de cuatro semanas.

3 Environmental Protection Agency, 820129, www.epa.gov/osw/hazard/testmethods.



I MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo se desarrolló un método analítico para la determinación de hidrocarburos totales de petróleo en suelos basados en los métodos EPA⁹: 3550, 3630, 8440. Para la preparación de la muestra, se procede a secarla a 60 °C por 24 horas. Se realiza una extracción sólido-líquido; luego se agita en un baño ultrasonido para asegurar un contacto íntimo con el solvente (Método EPA 3550). Se realiza una limpieza (clean up) con sílica gel para eliminar los compuestos polares como grasas y aceites (Método EPA 3630). Se utiliza la espectrofotometría de infrarrojos con transformadas de Fourier, para la detección y cuantificación de los TPH's (Método EPA 8440). Las condiciones de extracción, limpieza y cuantificación son probadas y puestas a punto, luego se procede a la validación del método desarrollado y se prueba su eficacia aplicándolo a muestras reales.

Equipos:

- Espectrofotómetro Infrarrojo con Transformadas de Fourier marca Perkin Elmer modelo Spectrum BX
- Equipo de Baño de Ultrasonido Branson
- Balanza analítica Mettler-Toledo con precisión de 0.1 mg

- Estufa
- Dispensador Eppendorf o similar

Reactivos:

- Solvente de extracción S 316 (policlorotri-floro etileno) p.a.
- Hexano grado técnico
- Ácido Clorhídrico p.a.
- Sílica gel de 100 a 200 mesh
- Metanol o acetona

Estándares y materiales de referencia:

- Material de Referencia Certificado marca: ERA, Catálogo 570
- Estándar de Hidrocarburos Totales de Petróleo, Marca: Chemservice, Catálogo: TPH418-1M, Mezcla GRO-DRO

Materiales:

- Celdas de cuarzo Marca Perkin Elmer, camino óptico 1.00 cm
- Puntas Eppendorf de 500 µl y de 5 ml
- Espátulas metálicas
- Botellas de vidrio ámbar de 100 ml, boca ancha, con tapa
- Pipetas volumétricas clase A de 1 ml, 5 ml, 10 ml, calibradas
- Balones de aforo clase A de 10 ml
- Pipetas Pasteur
- Goteros



Soluciones preparadas:

- Soluciones de las curvas de calibración: 10 mg/l, 100 mg/l, 500 mg/l, 1000 mg/l y 1500 mg/l

Se utiliza la extracción sólido-líquido en la cual se realizan varias pruebas, para adaptar la técnica a las condiciones del laboratorio y obtener los mejores porcentajes de recuperación.

Las variables experimentales que se pusieron a punto en esta etapa son: tamaño de muestra, cantidad de solvente de extracción, tiempo de extracción, cantidad de sílica gel para la limpieza (clean up). Con esta técnica se evitan pérdidas de las fracciones volátiles por incremento de temperatura, se buscaron las mejores condiciones experimentales para tener porcentajes de recuperación adecuados y disminuir las pérdidas de analito en el proceso. Cada una de las condiciones son probadas en el laboratorio utilizando material de referencia certificado y realizando la detección y cuantificación mediante el espectrofotómetro de infrarrojos con transformadas de Fourier, a la espera de porcentajes de recuperación de $100 \pm 10\%$.

El método validado fue aplicado a muestras de suelos en sistemas de columnas verticales, con una posterior re-

moción física del crudo derramado y simulación de precipitaciones fluviales durante un período comprendido de cuatro semanas.

Se ensambla un sistema de 13 columnas, con el fin de analizar los efectos del tiempo de remoción y las precipitaciones fluviales que sucedan durante un mes, con la migración de los TPH's del suelo hacia las aguas subterráneas (Gosh et al., 2007). Las columnas son de vidrio de 30 cm cada una, en cuya base poseen una salida para poder recolectar el agua de percolación; se rellenan con cantidades de suelo del orden de Inceptisoles, suborden Andepts del gran grupo Hidrandepts, los cuales poseen como características principales, altos contenidos de materia orgánica y se conforman de un alto porcentaje de arcillas.

Posteriormente se procede al empaque del suelo, uno de los sistemas debe ser utilizado como blanco del estudio, cuatro sistemas para la simulación de la remoción de crudo a las 24 horas, cuatro sistemas para la simulación de remoción a las 48 horas y cuatro sistemas para la simulación de remoción a las 72 horas. La remoción se efectúa físicamente, al extraer el crudo en su totalidad. Se recolecta además el agua de percolación.

Una vez ensamblados los sistemas, se procede a derramar en la superficie del suelo de cada columna, 5 mL de crudo para simular el derrame. Además, para producir un efecto real, diariamente se fue añadiendo 5.4 mL de

lluvia simulada. Semanalmente se recolectan las percolaciones obtenidas y se analizan los TPH's. Al final de las cuatro semanas del estudio, se examinan los TPH's de los suelos contenidos dentro de las columnas.

II RESULTADOS

a. Validación del método:

- Linealidad: fueron determinadas las pendientes e intersecciones de las curvas de calibración realizadas en un intervalo de 10 a 1500 mg/L de TPH's puros. Este es el rango de la curva y si se toma en cuenta la relación del volumen del solvente con el peso de suelo utilizado en el proceso de extracción, se obtiene un rango de 100 a 5000 mg/Kg. Los coeficientes de correlación de las curvas de calibración utilizadas para este trabajo son mayores a 0.999.
- Límite de detección: para la determinación de límite de detección, se realizó la lectura de fortificaciones en niveles bajos: 10, 25, 50, 75, 100 y 250 mg/kg, obteniéndose como valor del límite de detección a 25 mg/kg que corresponde a la menor concentración a la cual el equipo presenta una lectura.
- Límite de cuantificación: el límite de cuantificación del método analítico es la concentración de la fortificación que puede ser cuantificada con una recuperación de $100 \pm 10\%$. Se obtuvo una recuperación de 98.4% para la fortificación de 100 mg/kg y se determina a esta concentración como el límite de cuantificación.
- Precisión de repetibilidad y reproducibilidad: los resultados de las pruebas de repetibilidad y reproducibilidad realizadas en cuatro niveles de concentración de los TPH's –100, 500, 1000 y 5000 mg/Kg– se pueden apreciar en la Tabla 1. Todos los valores de los coeficientes de variación (%CV), tanto en condiciones de repetibilidad y de reproducibilidad son menores al 10%. Además, se obtienen porcentajes de recuperación dentro del objetivo de validación planteado: $100 \pm 10\%$.



Tabla 1: Resultados de precisión de repetibilidad (r) y reproducibilidad (R) para los TPH's

<i>Nivel</i>	<i>Media</i>	S_r	CV_r %	S_R	CV_R %	<i>Recuperación</i> %	$I \mu (k=2)$
100 mg/kg	104,709	10,4	9,9	9,4	9,5	104,7	11,89
500 mg/Kg	468,699	41,4	8,8	37,3	8,8	93,7	10,38
1000 mg/Kg	995,096	56,9	5,8	62,1	6,2	99,5	14,75
5000 mg/Kg	4912,847	76,1	1,6	72,9	1,5	98,3	11,53

- Exactitud: la recuperación que se obtiene al utilizar un material de referencia certificado es del 96.9%, cumple con el objetivo de validación. Este valor es aceptado, si se compara con los valores estipulados en el certificado del material de referencia.
- Incertidumbre: luego del proceso de validación se procedió a calcular la incertidumbre expandida del método, y se obtuvo como resultados: una $\mu (K=2) = 11.89$ mg/Kg para el rango 100-249 mg/Kg; una $\mu (K=2) = 12.56$ mg/Kg para el rango 250-499 mg/Kg; una $\mu (K=2) = 10.38$ mg/Kg para el rango 500-749 mg/Kg; una $\mu (K=2) = 7.07$ mg/Kg para el rango 750-999 mg/Kg; una $\mu (K=2) = 14.75$ mg/Kg para el rango 1000-1249 mg/Kg; y una $\mu (K=2) = 11.53$ mg/Kg para el rango 1250-5000 mg/Kg.

b. Aplicación del Método:

Todos los valores, excepto los correspondientes a la cuarta semana después de la remoción presentan valores de TPH's menores al límite de cuantificación del método analítico utilizado; además se observa que el valor de los TPH's que lograron migrar a través del agua de percolación, se incrementa su concentración a medida que aumenta el tiempo de remoción y aumenta las semanas de precipitación, es decir que el sistema de 24 horas para la remoción, menor contacto del suelo con el crudo tiene un valor de 0.4 mg/L; con un valor de 0.5 en el sistema de 48 horas de remoción; alcanzando hasta un valor de 0.7 mg/L en el sistema de remoción a las 72 horas; este último mantuvo el mayor contacto con el crudo antes de su remoción. En la figura N° 1, se observan los incrementos de la

concentración de TPH's en los sistemas de columnas correspondientes a la cuarta semana después de la remoción.

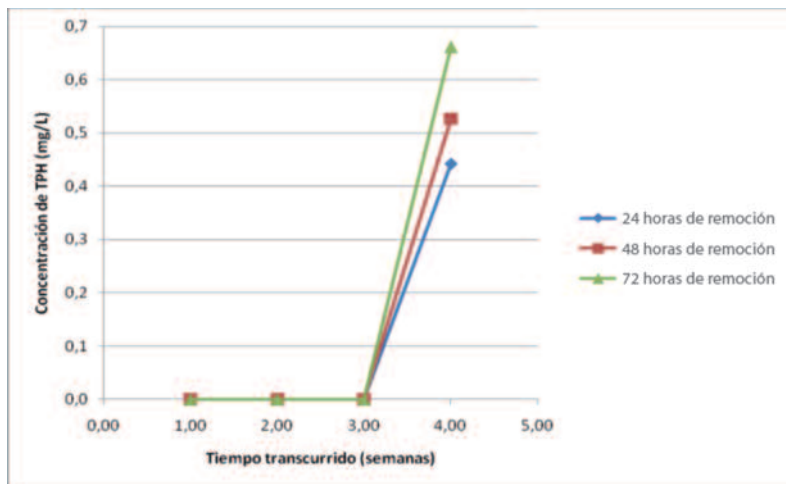


Figura N° 1: Comparación de los resultados de la determinación de TPH's en las muestras de agua de percolación de los tres sistemas de remoción del crudo, recogidas en función del tiempo

En el análisis de los suelos dentro de las columnas se incrementa la concentración de los TPH's, al transcurrir el tiempo desde la remoción; incremento que se observa desde los sistemas de remoción a las 24 horas del derrame. Estos presentan una menor concentración

con respecto a los sistemas de remoción a las 48 horas que a su vez presentan concentraciones menores que los sistemas de remoción a las 72 horas. Estas variaciones en la concentración de TPH's en los sistemas de columnas, pueden constatar en la figura N° 2.

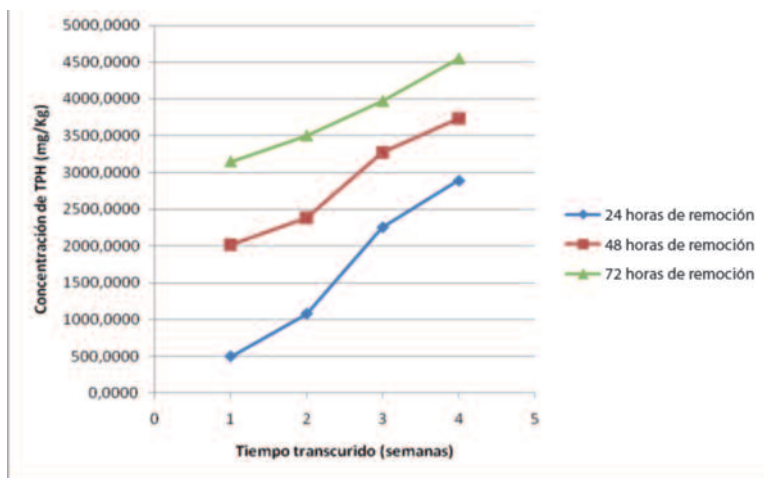


Figura N° 2: Comparación de las concentraciones de TPH's de los suelos entre los sistemas de remoción luego del derrame, con respecto al tiempo transcurrido de la simulación

III DISCUSIÓN

Dentro del proceso de puesta a punto del método, se determinan las condiciones óptimas tanto de extracción, "clean up" y cuantificación en las comprobaciones que arrojen resultados de porcentajes de recuperación cercanos a los ideales, es decir de $100\% \pm 10$.

Las condiciones determinadas como óptimas, posteriormente son utilizadas para el proceso de validación y también para la aplicación de las muestras reales.

Los resultados de la validación del método analítico, permiten la verificación de que este es exacto, preciso, repetible, reproducible, en un rango de determinación de 100 a 5000 mg/Kg; además se observa una correlación de los puntos de calibración de las curvas de cuantificación, lo cual demuestra que el ajuste de la función lineal es válido para la relación absorbancia-concentración. Al utilizar un método relativamente sencillo en el cual se obtienen resultados aceptables dentro de los objetivos de validación, en términos de

recuperación de estándares, se demuestra la aplicabilidad de este para posteriores ensayos con muestras reales y la robustez del método por su baja susceptibilidad a interferencias.

En la simulación del derrame de crudo controlado, se observa la presencia de hidrocarburos totales de petróleo en las aguas de percolación en la cuarta semana de precipitación y en los suelos dentro de los sistemas de columnas. Esto se debe a que los hidrocarburos logran distribuirse dentro del sistema edáfico a pesar del continuo paso de la precipitación simulada, la fina capa de crudo que quedó en la superficie del suelo en la columna luego de la remoción física, fue percolando incrementándose así la concentración de TPH's en el agua recogida. También, el incremento puede atribuirse al tiempo de contacto del suelo con el crudo, antes de ser removido.

Al tratarse de contaminación con sustancias orgánicas en el suelo, se observa que las fracciones ligeras, como gasolinas y aceites, forman una capa en la superficie y pueden movilizarse de una manera horizontal; mientras que las fracciones de hidrocarburos más densas, migran de manera vertical y pueden llegar a acuíferos subterráneos. Este fenómeno migratorio se da principalmente, por procesos de adsorción que alcanzan el equilibrio rápidamente y al saturarse, permiten el desplazamiento de los contaminantes (Barcelona et al., 1990).

Además, la persistencia de los contaminantes en el suelo, tiene una estrecha relación con los componentes del mismo, es así que los suelos con alto contenido de arcilla y de materia orgánica de suelo, permiten una mejor asociación con los contaminantes provocando que estos permanezcan adsorbidos a la matriz por más tiempo.

IV CONCLUSIONES

El método desarrollado para el análisis de los hidrocarburos totales de petróleo en suelos, mediante la espectrofotometría de transformadas de Fourier, utilizando extracción sólido-líquido por agitación en ultrasonido, logra el aislamiento, extracción, separación de

interferencias, detección y cuantificación adecuada de dichos compuestos, en un rango de trabajo de 100 a 5000 mg/Kg.

La técnica de extracción sólido-líquido mediante agitación en ultraso-



nido permite obtener porcentajes de recuperación entre 90 a 100%, lo cual es favorable conociéndose que los TPH's son compuestos altamente volátiles y que además pueden ser interferidos por los aceites y grasas de origen animal y vegetal.

El proceso de validación del método desarrollado da una evidencia objetiva que se tiene una adecuada precisión en los niveles efectuados, ya que cumple con lo estipulado para la aceptación de los coeficientes de variación, tanto para repetibilidad como para reproducibilidad. El método desarrollado se declara validado por cumplir los parámetros del objetivo de validación.

Las recuperaciones del material de referencia certificado, analizado con este método, son mayores al 96% y se encuentra dentro de los valores aceptables del certificado.

Los resultados del estudio demuestran que cuando sucede un derrame de crudo, se puede dar una contaminación no solamente del recurso suelo, sino también de las aguas de ríos o reservas subterráneas existentes, debido a que los TPH's logran migrar verticalmente por efecto del agua de percolación a través del suelo.

LITERATURA CITADA

- Atlantic RBCA, (2006), *Guidelines for Laboratories Tier 1 and Tier 2 Petroleum Hydrocarbon Methods*, Canadá, (s.n.).
- Barcelona, M., et al, (1990), *Contamination of Groundwater Prevention Assessment, Restoration*, Noyes Data Corporation. Estados Unidos.
- Cáceres, T., Heredia, W., (2010), *Contaminación de recursos renovables con hidrocarburos totales de petróleo: Un desafío para los químicos ambientales*, Revista Nuestra Ciencia, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Ecuador. 12(1), edición corregida, pp. 48-50.
- Centro de enseñanza e Investigación de IICA, (1969), *Panel sobre suelos derivados de cenizas volcánicas de América Latina. 6 al 13 julio 1969*.
- Decreto 1215*, (2001), Registro Oficial N° 265, martes 13 de febrero de 2001.
- Environmental Protection Agency, (2012), disponible en: www.epa.gov/osw/hazard/testmethods.
- Fernández, A., et al, (2001), *Validación de los métodos analíticos para la identificación y cuantificación del dextrometorfano jarabe*, Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos, Cuba, (s.n.).
- Fernández, L., et al, (2006), *Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados*, Instituto Mexicano del Petróleo, México, (s.n.).
- Ghosh, S., et al, (2007), *Breakthrough Absorption Study of Migratory Nickel in Fine-Grained Soil*, Water Environmental Research, Agriculture Journals, vol. 79 n° 9, pp.1023-1032.
- Ghosh, S., et al, (2007), *Breakthrough Absorption Study of Migratory Nickel in Fine-Grained Soil*, Water Environmental Research, Agriculture Journals, vol. 79 n° 9, pp.1023-1032.
- Kumar, S., et al, (2006), *A study for evaluation of contaminant transport characteristics through fine-grained soil*, Water Environmental Research, Agriculture Journals, n° 11, 2006 , pp. 2261-2267.
- Romaniuk, R., et al, (2007), *Atenuación natural y remediación inducida en suelos contaminados con hidrocarburos*, Argentina.
- Romero, D., (2010), *Desarrollo y validación de un método para la determinación de hidrocarburos totales de petróleo (TPH's) mediante espectrofotometría de infrarrojos con transformadas de Fourier en suelos fortificados*, Tesis, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Ecuador.
- Rius, X., et al, (1996), *La validación de métodos analíticos*, Departament



mento de Química Analítica y Química Orgánica, Instituto de Estudios Avanzados, Universitat Rovira i Virgili, España.

Total Petroleum Hydrocarbons Criteria Working Group Series, (1998), *Analysis of Petroleum Hydrocarbons in Environmental Media*, Estados Unidos.

Toxicological profile for Total petroleum hydrocarbons (TPH), (1999), disponible en: www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp123.pdf

DETERMINACIÓN, CUANTIFICACIÓN
Y COMPARACIÓN DE LA
CONCENTRACIÓN DE VITAMINA C
EN NARANJA (*Citrus aurantium*),
LIMÓN (*Citrus aurantifolia*)
Y MANDARINA (*Citrus reticulata*)
POR HPLC

DETERMINATION, QUANTIFICATION AND
COMPARISON OF THE CONCENTRATION THE
VITAMIN C IN ORANGE (*Citrus aurantium*),
LEMON (*Citrus aurantifolia*) AND TANGERINE
(*Citrus reticulata*) BY HPLC

FERNANDA MONTAÑO A.
PABLO POZO P.

Recibido 26 de marzo de 2012
Aceptado 9 de abril de 2012



DETERMINACIÓN, CUANTIFICACIÓN Y COMPARACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE VITAMINA C EN NARANJA (*Citrus aurantium*), LIMÓN (*Citrus aurantifolia*) Y MANDARINA (*Citrus reticulata*) POR HPLC

Fernanda Montaña A.¹ & Pablo Pozo P.¹

PALABRAS CLAVES: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia, vitamina C, extracción, fotosensible

KEY WORDS: High Performance Liquid Chromatography, vitamin C, extraction, photosensitive

RESUMEN

Se determinaron las condiciones analíticas adecuadas para cuantificar vitamina C en: naranja (*Citrus aurantium*), limón (*Citrus aurantifolia*) y mandarina (*Citrus reticulata*), por cromatografía líquida de alta eficiencia con detector ultravioleta-visible (HPLC UV-VIS), mediante la utilización de ácido metafosfórico al 6%, para la extracción.

El método consistió en determinar las condiciones óptimas para cuan-

tificar la concentración de vitamina C, ya que esta es inestable y fotosensible; por ello, fue importante conocer los parámetros que eviten las pérdidas del analito. Estos parámetros fueron: cantidad de muestra, eluyente y tiempo de análisis. Se optimizaron las condiciones cromatográficas para HPLC con una columna C18, marca Waters, 5 μm de partícula, 150 x 3.9 mm de diámetro, las condiciones establecidas fueron: fase móvil metanol: agua con una elusión isocrática de 90:10, cantidad de muestra de 20 μL , flujo 1.2 mL/min, longitud de

¹ Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Escuela de Ciencias Químicas (mafer_montano@yahoo.com) (pepozo@puce.edu.ec).

onda 245 nm y se trabajó a temperatura ambiente, evitando siempre la presencia de luz solar.

Se determinó la cantidad de vitamina C en los frutos cítricos a partir de la elaboración de tres curvas de calibración para cada día de análisis, con el empleo de un estándar de ácido ascórbico certificado; dando como resultado que la naranja (*Citrus aurantium*) contiene 56.46 mg/100 g, limón (*Citrus aurantifolia*) 41.57 mg/100 g y mandarina (*Citrus reticulata*) 32.75 mg/100 g.

ABSTRACT

Analytical conditions were determined suitable for quantify vitamin C in: orange (*Citrus aurantium*), lemon (*Citrus aurantifolia*) and tangerine (*Citrus reticulata*), by high performance liquid chromatography with ultra- violet-visible detector (HPLC UV-VIS), using an extraction with 6% metaphosphoric acid solution.

The application of this method was to try the optimum conditions to determine the concentration of vitamin C, because this is unestable and photo-sensitive, for that, it was important to know the circumstances that evaded analyte loss. These circumstances were: sample amount, eluent and analysis time. The chromatographic conditions were optimized to HPLC with a C18 column, brand Waters, 5 µm of particle diameter, 150 x 3.9 mm diameter, the established conditions were: mobile phase methanol : water with an isocratic elution of 90:10, sample amount of 20 µL, 1.2mL/min flow, wavelength 245nm and room temperature, always evading sunlight presence.

Vitamin C in citric fruits was determined from the elaboration of 3 calibration curves for the day of analysis, using a certified ascorbic acid standard; giving results that in orange we have 56.46 mg/100 g, lemon, 41.57 mg/100 g and tangerine 32.75 mg/100g

INTRODUCCIÓN

Las vitaminas son sustancias orgánicas esenciales para el funcionamiento celular, el crecimiento y el desarrollo normal. No son sintetizadas en el organismo y por tanto se deben obtener de fuentes externas. Las vitami-

nas son sensibles a diferentes agentes físicos y químicos, la más sensible de todas es la vitamina C, debido a que se degrada fácilmente por cambios de temperatura, exposición a la luz solar y concentración de oxígeno (Ferreira,



2005). La vitamina C es una vitamina hidrosoluble que se encuentra de forma natural en varias frutas y verduras.

Debido a que la vitamina C es termolábil se tiene una variación de la concentración con el paso del tiempo por esto, es importante establecer los mecanismos que afectan su estabilidad y que influyen en el tiempo de vida útil. Por su inestabilidad es necesario utilizar una técnica sensible y rápida que permita evaluar su concentración (Serra, 2007).

Para este estudio se tomaron tres frutos cítricos como variable, considerados de mayor consumo, como son: naranja (*Citrus aurantium*), limón (*Citrus aurantifolia*) y mandarina (*Citrus reticulata*). La toma de muestras se realizó en tres lugares de expendio de frutas; se recolectaron 10 muestras diarias entre naranjas, limones y mandarinas.

El objetivo de este trabajo fue el de aplicar un método analítico para extraer, identificar y cuantificar la vitamina C en naranja, limón y mandarina, al considerar la inestabilidad de esta vitamina. Además, la comparación entre el contenido de vitamina C presente en los frutos analizados.

Para la cuantificación se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con detector (UV-VIS), columna C18, flujo 2 mL/min., y tiempo de análisis de 5 min., técnica que ofrece las siguientes ventajas: menor tiempo de análisis, debido a que la técnica es automática en comparación con métodos tradicionales volumétricos y la aplicación de un agente extractante como el ácido metafosfórico al 6%, que permite estabilizar el ácido L-ascórbico y así poderlo cuantificar.

I METODOLOGÍA

Preparación de la muestra: las frutas se lavan y se rebanan en mitades para obtener el jugo mediante un extractor eléctrico. Se mide el contenido de los sólidos solubles totales (grados Brix) del jugo de cada fruta mediante un refractómetro que determina el punto óptimo de consumo. Los grados Brix re-

comendados en cítricos fluctúan entre (9 - 12 grados) (Roig et al. 1998).

Después de constatar su punto óptimo se procede a estabilizar el jugo de la fruta extraído, para evitar principalmente la oxidación de vitamina C. Se pesa por triplicado 5 g de la muestra y

se afora a 50 mL con ácido metafosfórico al 6%. Se analiza por triplicado cada muestra y por tres días en las mismas condiciones cromatográficas (Tabla 1).

Tabla 1: Número de muestras analizadas para cada día

Día	Curva de calibración	Muestras		
		Naranja	Limón	Mandarina
1	1	3	3	4
2	1	4	3	3
3	1	3	4	3
TOTAL	3	10	10	10

Solución de trabajo: a partir del estándar de ácido ascórbico con pureza del 100%, se prepara una solución patrón de 1000 mg/L (se pesa 0.1 g de ácido ascórbico en 100 mL de ácido metafosfórico al 6%); esta solución es preparada nuevamente cada día de comparación, se la utiliza para elaborar las curvas de calibración y para identificar la concentración de ácido ascórbico por comparación.

Ácido metafosfórico al 6%: se pesa 60 g del ácido y se afora a 1L con agua destilada para HPLC.

Tabla 2: Volúmenes de ácido ascórbico que se deben tomar para la preparación de soluciones de calibración a partir de la solución madre

Nivel	Alicuota (mL)	Volumen de aforo (mL)	Concentración (mg/L)
1	0.5	50	10
2	2	50	40
3	2	25	80
4	5	50	100
5	4	25	160

Condiciones cromatográficas

- Fase móvil: metanol-agua
- Gradiente: (90:10) (V/V)
- Flujo: 1.2 mL/min
- Volumen de inyección: 20 µL
- Temperatura de la columna: 25°C
- Detector: UV-VIS
- Longitud de onda de detección: 245nm

Una vez determinadas las condiciones cromatográficas se establecen las curvas de calibración con las soluciones de concentración conocida (Tabla 2) y se determina el tiempo de retención, inmediatamente se inyectan las disoluciones preparadas con las muestras estabilizadas. El tiempo de análisis del equipo es de 5 min. Las extracciones y estándares se inyectan por triplicado para evaluar la precisión del método, por lo tanto se tendrán 30 resultados al día.



II RESULTADOS

Para el cálculo de la concentración de ácido *L*-ascórbico se parte de la relación entre la concentración conocida del estándar y el área del pico co-

respondiente; así, si se aprecia el área del pico de cada muestra, se puede calcular su concentración respectiva.

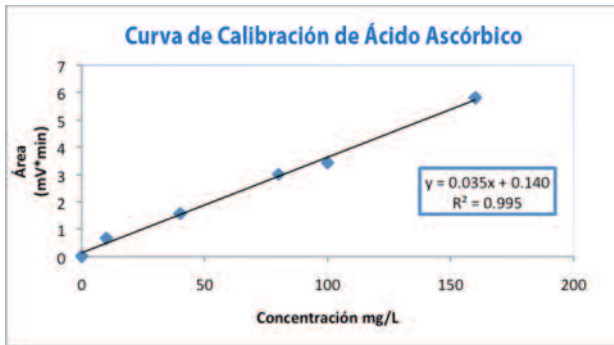


Figura 1: Curva de calibración, a partir de soluciones de concentración conocida, para el análisis del día 1

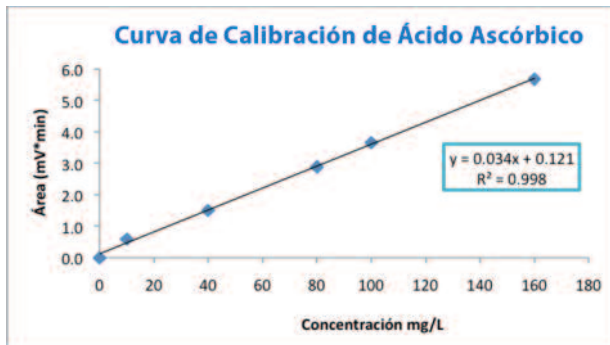


Figura 2: Curva de calibración, a partir de soluciones de concentración conocida, para el análisis del día 2

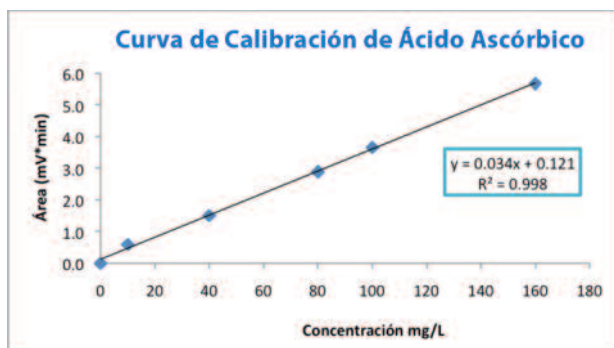


Figura 3: Curva de calibración, a partir de soluciones de concentración conocida, para el análisis del día 3

Tabla 3: Lectura de los estándares de calibración para el análisis de las muestras, de los días 1, 2 y 3

ESTÁNDARES	CONCENTRACIÓN (mg/L)	Área (mV*min)		
		Día		
		1	2	3
1	0	0	0	0
2	10	0,7	0,6	0,6
3	40	1,6	1,5	1,5
4	80	3,0	2,9	2,9
5	100	3,4	3,7	3,7
6	160	5,8	5,7	5,7

Después de obtener los resultados de las tres curvas de calibración, se calcula la media y la desviación es-

tándar de los coeficientes de correlación lineal, las pendientes y los interceptos (Tabla 4)



Tabla 4: Resumen de las curvas de calibración, coeficiente de correlación lineal, interceptos, medias aritméticas y desviación estándar

Curva	Coefficiente de correlación Lineal (R ²)	Pendiente (m)	Intercepto (b)
Día 1	0,9956	0,0350	0,1404
Día 2	0,9984	0,0349	0,1215
Día 3	0,9991	0,0360	0,0693
Medias (x)	-	0,0353	0,1104
Desviación estándar (s)	-	0,0006	0,0368
Límite inferior (x-3s)	-	0,0335	0,0000
Límite Superior (x+3s)	-	0,0371	0,2209

Con los datos anteriores (Tabla 4) se definen los límites de aceptación o rechazo que sirven para determinar parámetros de control en análisis futuros, además se demuestra la robustez del método al generar curvas reproducibles. Los coeficientes de correlación para el ajuste de las curvas de calibración son mayores a 0.99, lo cual demuestra que el ajuste a una función lineal es válido para la relación respuesta - concentración.

Se pueden observar las medias aritméticas de la concentración de vitamina C, determinada para la naranja, limón y mandarina (Tabla 5).

Tabla 5: Resultados del promedio de la concentración por triplicado para los tres días de análisis

MUESTRA	CONCENTRACIÓN (mg/100g)			
	Día 1	Día 2	Día 3	\bar{X}
Naranja	56.20	56.93	56.25	56.46
Mandarina	32.90	32.69	32.67	32.75
Limón	41.31	41.75	41.64	41.57

Para verificar estadísticamente si los resultados presentaron variaciones significativas, se realizó la prueba estadística ANOVA de un factor (Tabla 6).

Tabla 6: ANOVA de un factor

Descriptivos									
Muestras/Días	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	
					Límite inferior	Límite superior			
Naranja	1	9	56.2011	10.97176	3.65725	47.7675	64.6348	47.96	71.36
	2	9	56.9322	6.37101	2.12367	52.0350	61.8294	51.16	65.58
	3	12	56.2542	3.25633	.94002	54.1852	58.3231	52.09	62.19
Total	30	56.4417	6.96668	1.27194	53.8403	59.0431	47.96	71.36	
Mandarina	1	9	32,6678	,60369	,20123	32,2037	33,1318	31,87	33,40
	2	9	32,6844	2,79377	,93126	30,5370	34,8319	29,16	35,84
	3	12	32,9042	1,86829	,53933	31,7171	34,0912	29,43	34,66
Total	30	32,7673	1,89490	,34596	32,0598	33,4749	29,16	35,84	
Limón	1	9	41,3078	3,34935	1,11645	38,7332	43,8823	38,04	46,04
	2	9	41,6411	,73974	,24658	41,0725	42,2097	40,43	42,72
	3	12	41,7525	1,53695	,44368	40,7760	42,7290	39,52	43,69
Total	30	41,5857	2,04403	,37319	40,8224	42,3489	38,04	46,04	

ANOVA

Muestra		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Naranja	Entre días	3,108	2	1,554	,030	,971
	Dentro de días	1404,396	27	52,015		
	Total	1407,504	29			
Mandarina	Entre días	,376	2	,188	,049	,952
	Dentro de días	103,753	27	3,843		
	Total	104,128	29			
Limón	Entre días	1,057	2	,528	,119	,888
	Dentro de días	120,107	27	4,448		
	Total	121,164	29			



Al realizar ANOVA de un factor se puede demostrar que los valores de los resultados entre días de análisis no varían significativamente, día 1 es igual al 2 y al 3; por lo tanto se acepta la hi-

pótesis nula. Otro factor para aceptar esta hipótesis es que al analizar las medias no hay diferencia sobre la variación de cada grupo el día $1 > 2 > 3$.

III DISCUSIÓN

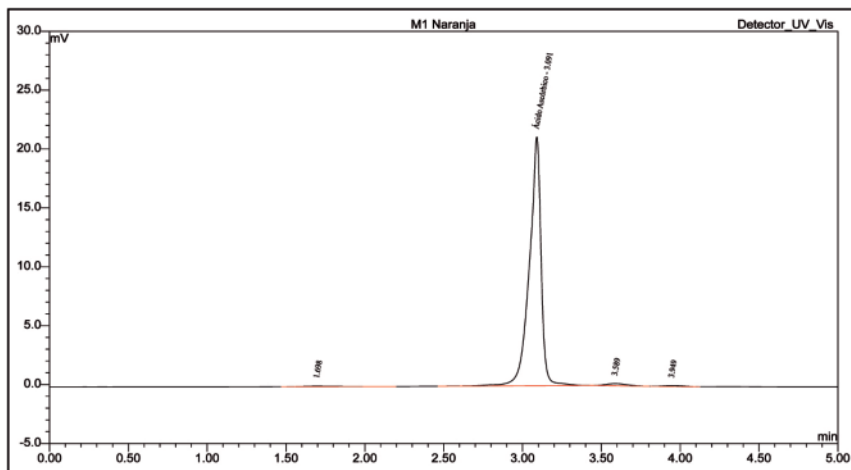
El método de extracción utilizado en esta investigación es el adecuado debido a que presenta recuperaciones similares a las obtenidas en otros estudios realizados (AOAC, 2005), no existen pérdidas de la cantidad de vitamina C y los picos obtenidos en la separación cromatográfica no presentan ninguna interferencia, son fácilmente cuantificables.

La extracción directa del jugo y su inmediata dilución con ácido metafosfórico al 6%, logra obtener la vitamina C y al mismo tiempo estabilizarla, para proceder con el análisis establecido sin realizar ningún proceso posterior; esto demuestra cierta ventaja frente a otras alternativas para lograr su estabilidad con la utilización de sustancias como: ácido cítrico, ácido benzoico, benzoato de sodio y sorbato de potasio (Cantarow & Schepartz, 1964), (Brause et al., 2003).

Se escogió la fase móvil metanol: agua (90:10) para la determinación por HPLC debido a que, luego de las pruebas realizadas, dicha fase logró una mejor separación del pico (mayor resolución) y permitió acortar el tiempo de corrida de 20 min., a 5 y obteniéndose resultados similares a otras técnicas que utilizan LC y distinta fase móvil para el análisis (Brause et al., 2003).

La optimización del método se realizó al probar diferentes columnas citadas en la bibliografía (Macrae, 1988), (Cantarow & Schepartz, 1964), la columna que dio mejor resultado es la utilizada en este método (Columna C18, marca Waters, *5 μm de tamaño de partícula y de diámetro 150 x 3.9 mm*), debido a que los picos tienen una óptima resolución (Figura 4).

Nombre de la muestra: **M1 Naranja**
 Programa instrumental: VITAMINA C
 Método de cuantificación: VITAMINA C
 Tiempo de corrida (min): 5,00



No.	Ret.Time min	NOMBRE	Height mV	Área mV	Rel.Área %	Conc. g/100g	Type
1	3,09	Ácido Ascórbico	21	1,83488	97,197634	50,275	BMB

Figura 4: Cromatogramas de las concentraciones de vitamina C, utilizados para cuantificar

IV CONCLUSIONES

El proceso de la determinación del ácido *L*-ascórbico utilizado nos permite estabilizarlo y tener una adecuada cuantificación sin problemas debido a su inestabilidad y termolabilidad.

El método utilizado para el análisis de la vitamina C en el jugo de frutos cítricos naranja, mandarina y limón, mediante HPLC, logra el aislamiento, extracción, separación de interferencias, detección y cuantificación adecuada de



dichos compuestos en un rango de 10 a 160 mg/100g. Cuando la concentración es menor a 10 mg/100g, el método sería ineficiente debido a su baja reproducibilidad.

Mediante este método analítico, es posible cuantificar *ácido L-ascórbico* en corto tiempo (5 minutos por muestra) con el uso de pequeñas cantidades de muestra 20 μ l.

La elaboración de curvas de calibración diarias, aseguran la confiabilidad de los resultados, debido a que se cuenta con soluciones estándares frescas; condición primaria como consecuencia de la inestabilidad de la vitamina C.

AGRADECIMIENTO

A los Drs. Carlos López y Germánico Silva, directivos y al personal de CENTROCE-SAL CIA. LTDA. Quito, Pichincha, Ecuador,

por su valiosa colaboración, al permitirnos la utilización de materiales y equipos para el análisis.



LITERATURA CITADA

- AOAC, (2005) Official Methods Of Analysis of Aoac International, 18th edition, United States.
- Becerra, W., (1997) *Adaptación de algunos cultivares de cítricos, en su tercera temporada de crecimiento en una zona agroecológica de la Octava Región (Portezuelo)*. 30 p. Tesis de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Concepción, Facultad de Agro-nomía, Chillán, Chile.
- Brause A. R., Woollard D. C. & Indyk H. E., (2003) Food composition and additives: Determination of Total Vitamin C in Fruit Juices and Related Products by Liquid Chromatography: Interlaboratory Study. *Journal of AOAC International*, VOL. 86, NO. 2, 2003, 367-374.
- Cantarow, A. y Schepartz, B., (1964) *Las vitaminas Bioquímica*. Tercera Edición, editorial Interoamericana, México.
- Ferreira A, (2005) *ABC de las Vitaminas*, Santiago de Chile, Chile.
- Gao X., et al. *Changes in Antioxidant Effects an their Relationship to Phytonutrients in Fruits of Sea Buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) during maturation*.
- IQB. <http://www.iqb.es/nutricion/vitaminac/vitaminac.htm>, 3 de diciembre del 2010.
- Latham M. C., (2004). *Nutrición humana en el mundo en desarrollo*, <http://www.fao.org>, consultado el 16 de abril del 2010.
- Macrae. R., (1988) *HPLC in Food Analysis*, 2da edición. United States.
- McGee W. Fuentes de Vitamina C. http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/esp_imagepages/18109.htm, 27 de agosto del 2010.
- Muñoz de Chávez M. & Ledesma A. J., (2002) *Los alimentos y sus nutrientes. Tablas de valor nutritivo de alimentos*.
- Murillo E., Carrasquilla L., (2000) *Actividad Antioxidante en Frutas Tropicales*. Rev. Lat. Quím.
- Natural Stándar Monograph. <http://www.naturalstandard.com/monographs/foreignlanguage/herbssupplements/patient-tangerine-sp.asp>, 14 de diciembre del 2010.
- Potter N., Hofchkisj J., (1995) *Ciencias de los Alimentos*. España.
- Quattrocchi, O.A.; Abelaira, S. L. and Laba, (1992) *Introducción a la técnica de HPLC; Aplicación y práctica*. Buenos Aires, Argentina.
- RELAQ. *Cromatografía Líquida de alta eficiencia*. <http://www.relaq.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/hplc.htm#Tipos>, 20 de noviembre del 2010.
- Rodríguez-Bernaldo de Quirós, M. Fernández-Arias, J. López-Hernández, (2009)



"A screening method for the determination of ascorbic acid in fruit juices and soft drinks.

Roig, M; Rivera, Z. y Kennedy, (1998) *Journal Food Science Nutrition*, España.

Rounds, M. A. & Gregory, J. F., (2003) *High Performance Liquid Chromatography*. En: S. S.

Rubinson K. & Rubinson K., (2000) *Análisis Instrumental*, Pretice Hall, Pearson Educación, S.A., Madrid, España.

San Román, L., Martín, M. & Montero M., (1993) *Vitaminas y vitámeros*. "Farmacología", España.

Serra Marcelo Horacio, (2007) *Acta bioquímica clínica Latinoamericana*, Buenos Aires, Argentina.

Skoog, D., Holler, J., Nieman, T., (2001) *Principios de Análisis instrumental*, quinta edición, McGraw Hill, España.

Sun F., et al., (2000) *Antioxidative Activity of Propolis Evaluated by the Interaction with Vitamins C and E and the Level of Lipid Hydroperoxides in Rats J.Agric. Food Chem.* USA.

U.S., (1995) *Pharmacopeia National Formulary 23 NF 18*, United States.

FORMULACIÓN DE UN
FITOFÁRMACO A PARTIR DE LAS
HOJAS DE *Ocotea quixos* (Lam.)
Kosterm. (ISHPINGO)

FORMULATION OF A PHYTOMEDICINE
FROM LEAVES OF *Ocotea quixos* (Lam.)
Kosterm. (ISHPINGO)

YOLANDA JIBAJA A.
MARCO DEHESA
MIGDALIA MIRANDA

Recibido 26 de marzo de 2012
Aceptado 9 de abril de 2012



FORMULACIÓN DE UN FITOFÁRMACO A PARTIR DE LAS HOJAS DE *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (ISHPINGO)

Yolanda Jibaja A.¹, Marco Dehesa², Migdalia Miranda³

PALABRAS CLAVES: *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm., aceite esencial, fitofármaco, ishpingo, extracto

KEY WORDS: *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm., essential oil, phytomedicine, ishpingo, extract

RESUMEN

En esta investigación se formuló un fitomedicamento a partir de las hojas de *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm., para ofrecer a la industria nacional una nueva formulación que debidamente estandarizada podría beneficiar a las comunidades indígenas, al contar con un medicamento de origen natural, efectivo y a bajo costo, además posibilitaría

mejorar la situación económica si se desarrollan cultivos de la especie.

Se estandarizó el extracto fluido de hojas obtenido por maceración, que sirve como materia prima para la elaboración del fitomedicamento. Los parámetros de calidad analizados son aceptables y por lo tanto permiten se lo considere como tal. A partir de este extracto se diseñó la formulación: tintura

1 Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Quito, Ecuador (yjibaja@puce.edu.ec).

2 Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador.

3 Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Cuba.

al 40% en etanol al 40%, la misma que presentó características organolépticas aceptables y parámetros de calidad que corresponden a los establecidos para este tipo de formulaciones. La tintura demostró buena estabilidad en vida de estante durante el tiempo que duró el estudio; sin embargo es necesario realizar un estudio de estabilidad a tiempos prolongados, con inclusión de su efectividad antimicrobiana.

El estudio se realizó con una muestra tomada en Archidona, provincia del Napo, Ecuador; se desarrolló en los Laboratorios de la Universidad Politécnica Salesiana y contó con el auspicio del Proyecto VIS-UPS.

ABSTRACT

This research developed a phyto-medicine or drug from the leaves of *Ocotea Quixos* (Lam.) Kosterm, to offer to the national domestic industry a new formulation that properly standardized could be a benefit to the community,

we could have a natural medicine, effective and at low cost.

We standardized fluid extract obtained by maceration of leaves, used as raw material for the production of phytomedicine or drug. The quality parameters analyzed are acceptable and therefore allow it considered as such. From this extract is designed the formulation: 40% dye in ethanol 40%, the same presented reliable organoleptic characteristics and parameters of acceptable quality that correspond with those established for this type of formulations. The dye showed good shelf life stability during the period of the study, but it is necessary to conduct a study of prolonged stability, including its antimicrobial effectiveness.

The study was conducted with a sample taken in Archidona, province of Napo, Ecuador; was developed in the laboratories of the Universidad Politécnica Salesiana and was sponsored by Project VIS-UPS.

INTRODUCCIÓN

Ocotea quixos (Lam.) Kosterm., es el nombre científico para el ishpingo, una Lauraceae que crece en las estribaciones orientales andinas y en la región Amazónica del Ecuador y posiblemente

al sur de Colombia, el uso principal en el Ecuador tanto de los cálices leñosos como de la corteza de las ramas es como aromatizante; en el campo de la medicina tradicional se lo ha utilizado



como infusión para atenuar los dolores estomacales y en forma de tintura para calmar el dolor de piezas dentales (White, 1985); se ha empleado y aún se emplea como especería para aromatizar ciertas comidas, como un postre especial que se sirve el 2 de noviembre denominada “colada morada” y también en algunas preparaciones de chicha de maíz.

Es conocido en el Ecuador con diferentes nombres vernáculos, entre los cuales se destacan: canela amazónica, canela de quijos, canela americana, canelo, ispingu o ishpingo. El hábitat natural de este árbol es el bosque húmedo tropical de la Amazonía ecuatoriana; se encuentra entre 310 y 1250 msnm y se destaca por ser endémico de este lugar. Es un árbol perenne de 8-12 m de altura;

las hojas de 14.5-23.5 cm de longitud por 3.5-6 cm de ancho, olor a canela, flor blanco-verdosa, cáliz persistente de seis sépalos y fruto ovalado de 4 cm de longitud. La especie florece y fructifica cada dos años cuando alcanza por lo menos quince años de madurez.

La parte más utilizada es la cápsula (estructura que rodea la base de la semilla), es dura y en forma de sombrero cónico; molidas se usan para dar sabor a dulces y comidas, contiene aceites esenciales semejantes a los de la canela. La bibliografía reporta a los cálices leñosos como la parte del vegetal tradicionalmente utilizados con olor a cinamón (Naranjo, 1981), constituido principalmente por cinnamaldehído, o-metoxicinnamaldehído, ácido cinámico y metil cinamato (Naranjo *et al.*, 1995).

I OBJETIVOS

Objetivo General:

Diseñar un fitofármaco estable y útil como antimicrobiano a partir de las hojas de *Ocotea quixos*.

Objetivos específicos:

• Realizar el estudio farmacognóstico de las hojas y cálices de *Ocotea quixos*.

- Extraer el aceite esencial de las hojas y cálices de *Ocotea quixos* y comparar su rendimiento y propiedades físico-químicas.
- Determinar la fracción bioactiva de las hojas de *Ocotea quixos*.

II MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección y preparación del material vegetal

Los cálices y las hojas de *Ocotea quixos* se colectaron según normas establecidas (CYTED, 1993), en Archidona, provincia del Napo, Ecuador (00° 45' 00" S 77° 48' 00" W); es una zona de clima cálido-húmedo caracterizada por una diversa flora y fauna, una amplia red hidrográfica, abundantes precipitaciones atmosféricas y temperaturas que oscilan entre 25-30°C. Los ejemplares colectados se colocaron dentro de hojas de papel periódico dobladas por la mitad, para proceder a su herborización y finalmente un ejemplar se envió al Herbario de la Universidad Católica para su comprobación taxonómica.

Las hojas y cálices se lavaron con agua potable y desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante 30 minutos; se escurrió el agua y se colocaron en bandejas correctamente identificadas para el secado a temperatura ambiente. El material seco se trocó manualmente y guardó en fundas de papel para protegerlos de la luz.

Valoración de las drogas

Para la evaluación macromorfológica

de hojas y cálices, se utilizó una muestra de 50 hojas, se determinó el largo y ancho con una regla graduada para el posterior análisis estadístico.

Para la evaluación físico-química se determinó el porcentaje de cenizas totales, cenizas solubles en ácido y humedad, según la norma cubana (NRSP 309, 1992).

Se identificaron los metabolitos secundarios presentes en hojas y cálices por la técnica de Tamizaje fitoquímico descrita por Miranda & Cuellar (2001).

Control microbiológico de hojas y cálices de *Ocotea quixos*

Para el control microbiológico se realizó el conteo total de microorganismos y el control de microorganismos específicos, se trabajó con la metodología planteada por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1998).

Extracción, cuantificación y caracterización preliminar del aceite esencial de *Ocotea quixos*

Se extrajo el aceite de una muestra seca de 100 g, mediante hidrodestilación durante dos horas, la emulsión fría aceite-



agua se saturó con cloruro de sodio. Se añadió éter etílico, se agitó y dejó en reposo hasta que estén separadas las fases. Se eliminó el agua de la capa etérea con sulfato de sodio anhidro, el éter se retiró por evaporación y se determinó el rendimiento.

Se realizó la caracterización físico-química del aceite esencial (color, olor, densidad relativa y el índice de refracción) y se analizaron muestras de aceite esencial obtenidos de tres destilaciones separadas por cromatografía de gases.

Determinación de la fracción bioactiva de las hojas de *Ocotea quixos*

Se comprobó la actividad inhibitoria de extractos, fracciones acuosas y aceite esencial frente a varios microorganismos. Para obtener los extractos fluidos se trabajó según la Norma Cubana para extractos vegetales (NRSP 311, 1992). Para comprobar la actividad antimicrobiana se procedió según la Técnica de Bauer-Kirby (CYTED, 1991). Se utilizaron los microorganismos: *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Cándida albicans* (ATCC 10231), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 9027), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Streptococcus* sp., y *Proteus* sp.,

procedentes del laboratorio de Microbiología de la Universidad Católica. Como controles positivos se emplearon Gentamicina, Ampicilina y Fluconazol, procedentes de los Laboratorios LIFE, Acromax y Pfizer y como controles negativos se emplearon los vehículos en los cuales se encontraban las muestras.

Especificaciones de calidad del extracto fluido de hojas de *Ocotea quixos* en etanol al 80%

Se determinaron los parámetros pH, características organolépticas, índice de refracción, densidad relativa, contenido de sólidos totales, contenido alcohólico y análisis capilar según la Norma Cubana para extractos vegetales (NRSP 312, 1992) y el contenido de aceites esenciales por hidrodestilación (OMS, 1998).

Formulación de un fitomedicamento a partir del extracto fluido de las hojas de *Ocotea quixos*

Se diseñó la formulación del fitomedicamento y se evaluaron sus propiedades organolépticas, pH, densidad relativa, índice de refracción, contenido alcohólico, contenido de aceite esencial y estabilidad natural.

III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio Farmacognóstico de *Ocotea quixos*

La evaluación macromorfológica de hojas y cálices de *O. quixos* reporta las siguientes características:

Hojas: forma: peciolada, acuminada, aguda, entera, coniforme, palminervia. Textura: coriáceas. Superficie: glabra. Color: envés verde - amarillento. Olor: muy agradable, dulce al masticar. De 13.4 cm de largo y 4.1 cm de ancho. Muy brillantes.

Cálices: forma: semejan pequeños embudos con los bordes dirigidos al exterior de 3 cm de diámetro por 4 cm de largo. Resistentes a la presión manual, de color café oscuro, de olor muy agradable, con un peso promedio de 2.67 g. Presentan rugosidades en los bordes externos.

Las observaciones corresponden con las señaladas por Gupta (1995) con respecto a los cálices; la misma fuente se refiere a las flores frescas de la planta, que no pudieron ser observadas ni colectadas, debido a que la fecha de recolección (junio) no coincidió con la época de floración de la especie.

Parámetros de control de calidad

El contenido de cenizas totales en hojas y cálices (4.78 y 2.8% respectivamente) se encuentra dentro de los rangos establecidos por la OMS (1998) y USP (2001), de esos valores, más del 50% son solubles en agua en el caso de las hojas (2.8%) y casi la totalidad de los obtenidos de cálices (2.7%), lo cual sugiere que se trata de metales de baja toxicidad o material de tipo orgánico. El porcentaje de humedad residual en hojas y cálices (8 y 12% respectivamente), corresponde a valores comprendidos dentro del rango establecido para drogas vegetales (Miranda, 2001; Sharapin 2000). Tabla 1.

Tabla 1: Evaluación físico-química de hojas y cálices de *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm

ENSAYO	HOJAS	CÁLICES
Cenizas totales	4.8 %	2.8 %
Cenizas solubles en agua	2.8 %	2.7 %
Humedad	8.0 %	12.0 %

Tamizaje fitoquímico:

El tamizaje fitoquímico constituye uno



de los análisis que se utiliza para la determinación cualitativa de los principales grupos de constituyentes químicos presentes en las plantas. Los resultados

del tamizaje fitoquímico en los extractos acuoso, alcohólico y etéreo de las hojas y cálices de *Ocotea quixos*, se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2: Tamizaje fitoquímico de hojas y cálices de *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm

METABOLITO	EXTRACTO					
	Etéreo		Alcohólico		Acuoso	
	Hojas	Cálices	Hojas	Cálices	Hojas	Cálices
Aceites y grasas	+/-	+/-				
Alcaloides	-	-	-	-	-	-
Triterpenos						
Esteroides	-	-	-	-		
Saponinas			+	+	+	+
Azúcares Reductores			+	+	+	+
Fenoles y taninos			+	+	+	+
Aminoácidos			-	-		
Flavonoides			+	+	+	+
Cardenolidos			+	+		
Quinonas			-	-		
Antocianidinas			+	+		
Mucilagos					-	-

Los metabolitos secundarios identificados son saponinas, azúcares reductores, fenoles y taninos, flavonoides y aceites esenciales, estos aunque no dieron una franca reacción con Sudán, se detectaron por su intenso aroma. Los metabolitos taninos y glúcidos corresponden a

los componentes mayoritarios identificados en la canela (Hussain, 1988).

Control microbiológico

Los valores de aerobios totales (300 UFC/g y 340 UFC/g) en hojas y cálices

respectivamente, están dentro de los rangos establecidos por la OMS (WHO, 1998), referente a límites permitidos para drogas crudas no tratadas, el ensayo para determinar mohos y levaduras fue negativo. Tabla 3.

**Tabla 3: Control microbiológico de hojas y cálices de *Ocotea quixos*.
 Contaje en placa**

MICROORGANISMOS	RESULTADOS		
	Hojas	Cálices	Límites máximos*
Aerobios totales	300 UFC/g	340 UFC/g	10 ⁷ UFC/g
Mohos y levaduras	< 10 upml/g	< 10 upml/g	10 ⁵ upml/g

*(OMS, 1998)

El ensayo para microorganismos específicos, Tabla 4, reporta la presencia de *Coliformes*, *Salmonella* y *Pseudomona* en hojas, revela la contaminación de la droga en el momento de la colección y transporte y un mal lavado del material vegetal en el laboratorio, en el caso de los cálices el ensayo para *Salmonella* es positivo.

Estos resultados indican la necesidad de realizar controles rigurosos e incrementar la desinfección del material vegetal, antes de emplearlo para la elaboración de un fitomedicamento

Tabla 4: Control microbiológico para microorganismos específicos

MICROORGANISMO	PRESENCIA DE MICROORGANISMOS	
	Hojas	Cálices
<i>Coliformes</i>	+	-
<i>Salmonella</i>	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
<i>Pseudomona</i>	+	-

Rendimiento y características físico-químicas del aceite esencial de *Ocotea quixos*

Para extraer el aceite esencial de hojas y cálices se empleó el método de hidro-



destilación. El rendimiento del aceite esencial de cálices fue de 1.24%, obtenido después de 2 horas de destilación con el empleo de cálices troceados manualmente. Guerrini *et al.*, (2006) reportó el 1.9% de rendimiento mediante hidrodestilación acoplada al aparato comercial Clevenger después de 8 horas de destilación; la literatura no informa datos respecto a aceite esencial extraído de hojas, pero en este caso el rendimiento fue del 0.88%.

Las características físico - químicas del aceite esencial se indican en la Tabla 5, la densidad relativa e índice de refracción son más altos para el aceite esencial de las hojas comparado con el de los cálices.

Análisis cromatográfico del aceite esencial de *Ocotea quixos*

El análisis por Cromatografía de gases del aceite de cálices, Figura 1, revela la presencia de dos picos importantes con tiempos de retención: 12.213 y 13.718 minutos; en tanto que en el aceite de hojas, Figura 2, se observaron también dos picos importantes con una ligera variación en sus tiempos de retención (12.117 y 13.677 minutos) respecto al aceite de cálices.

Tabla 5: Características físico - químicas del aceite esencial de *Ocotea quixos*

Parámetro	Hojas	Cálices
Rendimiento	0.88%	1.24%
Olor	Dulce, agradable	Dulce, agradable
Color	Amarillo claro	Amarillo claro
Índice de refracción	1.59	1.57
Densidad	0.93	0.77



Determinación de la fracción bioactiva de las hojas de *Ocotea quixos*

Los hidrodestilados remanentes de la destilación (fracción sin aceite) no presentaron actividad antimicrobiana, lo cual indica que esta no puede atribuirse a ningún componente soluble en agua.

De los extractos fluidos analizados, el obtenido en etanol al 80% presentó actividad frente a los microor-

ganismos ensayados, excepto frente a *Pseudomona aeruginosa*.

El aceite esencial presentó mayor actividad, desarrolló halos de inhibición en todos los casos superiores a los desarrollados por los antimicrobianos de síntesis empleados como patrón, a pesar que las concentraciones empleadas fueron menores, 20µL. (Tabla 6).

Tabla 6: Actividad antimicrobiana de hojas de *Ocotea quixos*

Microorganismo	Halos de inhibición (mm)							
	Extracto alcohólico al 80%	Extracto alcohólico al 50%	Extracto alcohólico puro	Fracción sin aceite 1	Fracción sin aceite 2	Aceite esencial	Ampicilina Control A	Cloranfenicol Control B
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	9	8	19	0	0	42	0	17
<i>Streptococo</i> sp	10	8	23	0	0	40	23	22
<i>Bacillus subtilis</i>	20	11	22	0	0	40	30	35
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	8	5	11	0	0	29	0	0
<i>Cándida albicans</i>	>70	0	>70	0	0	>70	>70	>70
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	10	14	0	0	40	16	20.5
<i>Proteus</i> sp	11	8	15	0	0	37	21.5	20.5
<i>Escherichia coli</i>	18	10	15.5	0	0	39	17.5	27.5

El análisis de los controles negativos mostró que la actividad antimicrobiana de las diferentes fracciones no se

debía al efecto antiséptico del etanol como se ha demostrado en algunos trabajos realizados por Egas (1999).

Parámetros de calidad del extracto fluido en hojas de *Ocotea quixos*

Los parámetros de calidad del extracto fluido, Tabla 7, muestran las especificaciones de calidad de la materia prima utilizada para la preparación del fitofármaco. Los parámetros organolépticos del extracto fluido no tienen estándares de referencia para su comparación, ya que estos son propios y característicos de la especie y de la parte de la planta analizada. Los pará-

metros físicos: el pH, 5.7, demuestra la presencia de compuestos químicos con características ácidas débiles como flavonoides, taninos, entre otros; el índice de refracción 1.38 es mayor al del agua, revela la presencia de sustancias disueltas; los sólidos totales son inferior al límite mínimo establecido por la OMS; el contenido alcohólico del extracto fluido es inferior al valor inicial utilizado para la preparación del mismo, lo cual significa que este se pierde por evaporación.

Tabla 7: Parámetros de calidad del extracto fluido de hojas de *Ocotea quixos*

PARÁMETRO	RESULTADOS
Descripción organoléptica	Olor agradable, dulce, similar al de la canela. Líquido homogéneo de color café claro, translúcido, no se observan partículas suspendidas.
pH	5.7
Índice de refracción	1.38
Densidad relativa a 20 °C	0.94
Sólidos totales	2.36%
Contenido alcohólico	52.64%
Contenido de aceite esencial	0.51%
Análisis capilar	Imagen coloreada en tono café amarillento; normal (6.2 cm); presenta una franja irregularmente dentada translúcida de color café oscuro, la subfranja de un tenue color café de 1.4 cm de amplitud; la banda de color café intenso de 1.3 cm y la sub-banda muy amplia de color café verdoso. Por efecto de la luz UV de 366 nm la franja se torna de un color verde intenso, el resto de la imagen toma una coloración café rojiza. Con vapores de amoníaco la franja presenta una intensa coloración amarilla de 2 mm de ancho y el color de la banda es café oscuro.



Estudio de estabilidad forzada del extracto fluido en etanol al 80%

El análisis por cromatografía en capa delgada, CCD, demostró que después del tratamiento ácido, básico y oxidativo al cual se sometió al extracto, mostró perfiles cromatográficos diferentes al del extracto sin degradar; el perfil cromatográfico del tratamiento con luz UV resultó muy similar al extracto sin degradar.

Las soluciones degradadas se analizaron cualitativamente por cromatografía de gases, GC, y comparadas con el extracto sin degradar, presentaron resultados diferentes.

Diseño de la formulación

De acuerdo con el diseño experimental utilizado, se escogió la concentración del extracto fluido en la tintura a formular, de dos variantes de formu-

lación. El análisis estadístico demostró que la tintura al 40% resultó ser la de mayor eficacia por su actividad antimicrobiana a una concentración de 70 μ L, presentó los mejores halos de inhibición en todos los microorganismos ensayados, Tabla 8.

Estudio de la estabilidad de la tintura al 40%

La tintura seleccionada se sometió a un estudio de estabilidad natural durante 14 días. Los resultados, Tabla 9, demuestran que los parámetros analizados se mantienen estables, el pH varió de 5.5 a 5.6; el índice de refracción se mantiene constante, 1.36; el contenido alcohólico presenta una disminución, puede ser por evaporación del disolvente y el contenido de aceite esencial se mantiene en rangos desde 0.008 - 0.0070%, la disminución se atribuye también a una posible evaporación.

Tabla 8: Actividad antimicrobiana de tinturas de hojas de *Ocotea quixos*

Microorganismo	Halos de inhibición (mm.)								
	Tintura al 20%			Tintura al 40%			Controles		
	30µL	50µL	70µL	30µL	50µL	70µL	G50µL	C50µL	F50µL
<i>St. epidermidis</i>	10.3	11	12	10	12.6	13.6	29	24	
	10	10	11	10.6	11	11.2	30	22	
	9.2	11	12	10.3	11	13	30	25	
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	30	0	
	0	0	0	0	0	0	30	0	
	0	0	0	0	0	0	28	0	
<i>Bacillus subtilis</i>	10	10	10	11	11	14	35	30	
	10	10	10	10	11	12	35	31	
	9	10	10	10	11	12	35	30	
<i>Cándida albicans</i>	10	11	12	11	13	13	30		0
	9	10	11	11	12	13	30		0
	8	10	10	10	11	12	30		0
<i>St. aureus</i>	0	10	9	10	12	13	24		
	0	8	10	10	11	12	24		
	0	8	10	10	11	13	24		
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	22		
	0	0	0	0	0	0	22		
	0	0	0	0	0	0	22		
<i>Streptococo</i> sp	0	0	8	7	8	9	24		
	0	0	7	7	8	9	24		
	0	0	7	7	8	9	24		
<i>Proteus</i> sp.	0	0	8	0	0	8	12		
	0	0	8	0	0	8	13		

Leyenda: C: Cloranfenicol, F: Fluconazol, G: Gentamicina



Tabla 9: Estabilidad natural de la tintura al 40% de hojas de *Ocotea quixos*

Parámetro	Tiempo 0 días	Tiempo 7 días	Tiempo 14 días
Descripción organoléptica	Líquido café claro translúcido, olor agradable, dulce	Líquido café claro, translúcido, olor agradable, dulce	Líquido café claro,, translúcido, olor agradable, dulce
pH	5.5	5.5	5.6
Índice de refracción	1.36	1.36	1.36
Densidad relativa	0.95	0.95	0.95
Contenido alcohólico	41.6%	41.28%	32.23%
Contenido de aceite esencial	0.008 %	0.0072%	0.0070

Temperatura: 19°C

Humedad ambiental: 45%

Inicio: 4 de abril del 2003

Término: 18 de abril del 2003

Tamaño del lote: 200 mL.

Envase de la tintura: vidrio ámbar calidad tipo I y tapa rosca de polipropileno

IV CONCLUSIONES

1. Los parámetros de calidad de las hojas y cálices de *Ocotea quixos*, se encuentran en el rango establecido para drogas vegetales.
2. Se obtuvieron los aceites esenciales de hojas y cálices, el rendimiento es menor en las hojas.
3. La caracterización físico - química de los aceites esenciales demostró que el aceite de las hojas, enseñan mayor densidad relativa e índice de refracción que el aceite de los cálices y desde el punto de vista cualitativo presentan una composición similar.
4. A través del estudio de la actividad antimicrobiana se demostró que la fracción bioactiva de las hojas de *O. quixos* corresponde al aceite esencial.
5. El extracto fluido de hojas de *O. quixos* en etanol al 80%, mostró actividad antimicrobiana.

6. El estudio físico - químico del extracto fluido de hojas de *O. quixos* en etanol al 80%, permitió establecer especificaciones de calidad del mismo, como materia prima para elaborar fitofármacos.
7. Se diseñó una tintura al 40% de hojas de *O. quixos* de calidad farmacéutica estable al menos por 14 días, en el envase estudiado y con las condiciones de temperatura y humedad ambientales analizadas, útil como antimicrobiano frente a *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Cándida albicans* y *Bacillus subtilis*.



LITERATURA CITADA

CYTED. (1991). *Manual de técnicas de investigación. Subprograma de Química Fina Farmacéutica. Proyecto X-1. Búsqueda de principios Bioactivos de Plantas de la Región*. [s.n].

Cuba, Ministerio de Salud Pública. (1992). *Medicamentos de origen vegetal: Droga cruda. Métodos de ensayo*. La Habana, Cuba: MINSAP.

Cuba, Ministerio de Salud Pública. (1992). *Medicamentos de origen vegetal: Extractos y Tinturas. Procesos Tecnológicos*. La Habana, Cuba: MINSAP.

Cuba, Ministerio de Salud Pública. (1992). *Medicamentos de origen vegetal: Extractos y Tinturas. Métodos de ensayo*. La Habana, Cuba: MINSAP.

Egas, J. (1999). *Laboratorio de Microbiología*. Manual no publicado, Universidad Católica, Quito, Ecuador.

Guerrini, A. & Sacchetti, G. (2006). Composition of the volatile fraction of *Ocotea bofo* Kunth (Lauraceae) calyces by GC-MS and NMR fingerprinting and its antimicrobial and antioxidant activity. *Agric Food Chem*, 54 (20), 7778-88.

Gupta, M. (1995). *270 Plantas Medicinales Iberoamericanas*. Bogotá, Colombia: Editorial Presencia Ltda.

Hussain, A. & Virmani, O. (1998). *Major essential oils bearing plants of India*. Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants. Lucknow.

Miranda, M. & Cuellar, A. (2001). *Manual de prácticas de laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales*. Cuba: Editorial MES.

Naranjo, P. & Escaleras, R. (1995). *Farmacología y Medicina tradicional*. Quito, Ecuador: Universidad Andina Simón Bolívar.

Naranjo, P. (1981). *Fundamentos de Farmacología médica*. (3ª.ed.). Quito, Ecuador: Editorial Universitaria.

Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos*. Bogotá, Colombia. Convenio Andrés Bello.

White, A. (1985). *Hierbas del Ecuador: Plantas medicinales*. Quito, Ecuador: Ediciones Libri Mundi.

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA
ESTRUCTURA QUÍMICA
DEL ANETOL EXTRAÍDO DEL ANÍS
ESTRELLADO (*Illicium verum*) CON
EL PRODUCTO SINTÉTICO
Y COMPUTACIONAL

COMPARATIVE STUDY OF THE CHEMICAL
STRUCTURE OF ANETHOLE ISOLATED FROM
STAR ANISE (*Illicium verum*) WITH THE
SYNTHETIC AND COMPUTATIONAL PRODUCT

MARÍA FERNANDA PILAQUINGA
LORENA MENESES

Recibido 26 de marzo de 2012
Aceptado 9 de abril de 2012



ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ESTRUCTURA QUÍMICA DEL ANETOL EXTRAÍDO DEL ANÍS ESTRELLADO (*Illicium verum*) CON EL PRODUCTO SINTÉTICO Y COMPUTACIONAL

María Fernanda Pilaquinga¹, Lorena Meneses¹

PALABRAS CLAVES: Anetol, anís estrellado, síntesis, B3LYP, espectroscopía de infrarrojos

KEY WORDS: Anethole, star anise, synthesis, B3LYP, infrared spectroscopy

RESUMEN

En el presente estudio se comparó la estructura química del anetol extraído del anís de la especie *Illicium verum* con el producto sintético y computacional. La metodología experimental se basó en la extracción, aislamiento y purificación de anetol natural a partir de muestras comerciales de anís estrellado. El anetol sintético se preparó a nivel de laboratorio mediante una reacción selectiva a partir de anisol y cloruro de propionilo. El modelamiento com-

putacional de la síntesis química se realizó en el software *Gaussian03* con el empleo del funcional híbrido B3LYP y el conjunto de bases 6-31G (d) y se obtuvieron los espectros infrarrojos teóricos de los isómeros geométricos *cis* y *trans* anetol. La caracterización del anetol natural, sintético y teórico se realizó por espectroscopia de infrarrojos. Los resultados demostraron que la estructura química del principio activo del anís estrellado fue *trans*-anetol y del producto sintético *cis* y *trans* anetol. En el anís estrellado el rendimiento de aceite esen-

¹ Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Escuela de Ciencias Químicas, Quito, Ecuador (mpilaquingaf@puce.edu.ec).

cial fue 2,18 %, del cual 1,44 % corresponde al *trans*-anetol. En el anetol sintético se obtuvo un rendimiento del 58.18%. Finalmente, se comprobó computacionalmente que la estructura química del *trans*-anetol es más estable que su análogo *cis*, debido a una diferencia energética de 2.63 kcal/mol, es por ello que presenta mayor abundancia relativa en la naturaleza.

ABSTRACT

In this research, the chemical structure of anethole extracted from anise of *Illicium verum* has been compared with the synthetic and computational product. The experimental methodology carried out extraction, isolation and purification of natural anethole starting from commercial samples of star anise. Synthetic anethole was prepared by a selective reaction starting from anisole and propionyl

chloride. Computational modeling of synthesis reaction was carried out in *Gaussian03* software using the B3LYP method and 6-31G (d) basis set. Characterization of natural and synthetic anethole was done by infrared spectroscopy; theoretical IR spectra of *cis* and *trans*-anethole were obtained and optimized. By analyzing experimental and theoretical spectra, the results showed that the chemical structure of the extracted compound corresponds to *trans*-anethole meanwhile the synthetic product had both *cis* and *trans* anethole. Isolation yield from star anise was 2.18 % from which 1.44 was *trans*-anethole; contrary to the synthetic anethole which had a yield of 58.18%. The chemical structure of *trans*-anethole was studied computationally; compared to *cis*-anethole it showed an energy difference of 2.63 kcal/mol. Therefore, *trans*-anethole has great abundance in nature.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de modernos métodos de análisis instrumental permite una identificación exhaustiva de los componentes presentes en diferentes plantas, particularmente los responsables del perfil aromático, sutileza y finura de los productos naturales, lo cual

abre nuevas posibilidades en la obtención de compuestos interesantes. Con el avance de la Química Computacional, el modelamiento de rutas sintéticas apuesta a la producción de nuevos compuestos, para propiciar mayores adelantos en procesos que permiten

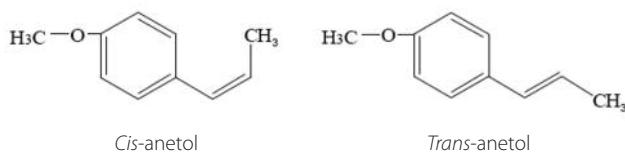


modificar productos naturales complejos con éxito, o se pueden obtener por síntesis total en un período relativamente corto.

El anetol por ejemplo, es el principio activo responsable del olor característico y de las propiedades medicinales atribuidas principalmente al anís de las especies *Illicium verum* y *Pimpinella anisum*. La importancia de este compuesto químico se basa en su potencial interés industrial y científico, ya que se emplea como materia prima en las in-

dustrias: alimenticia, agroindustrial, cosmética, farmacéutica, licorera y química.

En cuanto a su obtención a través de procesos de síntesis química, se presentan disponibles diferentes tipos de reacciones de acuerdo con el isómero geométrico deseado tipo *cis* o *trans* (ver Figura 1). Sin embargo, el modelamiento computacional de este tipo de moléculas orgánicas, es una rama de la química que en nuestro país no registra antecedentes.



**Figura 1: Isómeros geométricos del anetol
(1-metoxi-4-(1-propenil)benceno)**

I OBJETIVO

Comparar la estructura química del anetol extraído del anís estrellado de la especie *Illicium verum* con su correspondiente producto sintético y computacional mediante un análisis es-

pectoscópico infrarrojo experimental y teórico, para demostrar de esta manera el tipo de isómero geométrico que presenta mayor estabilidad y por lo tanto abundancia en la naturaleza.

II MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTREO

Muestra: Anís estrellado (*Illicium verum*)

Tipo de muestreo: Norma ISO 948 para especias y condimentos

Lugar de muestreo: bodegas mayoristas de especias y condimentos de diferentes locales comerciales en la ciudad de Quito

Período de muestreo: las muestras se tomaron en cinco períodos correspondientes a un mes cada uno para asegurar que pertenezcan a lotes diferentes

Número total de muestras: 25

Tipo de muestras: la información de las muestras tomadas se indica en la Tabla 1

Tabla 1: Información de las muestras analizadas

Marca comercial	Presentación	Tratamiento posterior a la recolección y secado
Sin marca	Cajas de 10 Kg	Ninguno
Doña Petra®	Empaques de 100 g	Tamizado, secado, selección, empaçado
El Aroma®	Empaques de 50 g	Tamizado, secado, selección, empaçado
El Sabor®	Empaques de 50 g	Tamizado, secado, selección, empaçado
Mc Cormick®	Empaques de 25 g	Tamizado, secado, selección, irradiación, empaçado

OBTENCIÓN DEL ANETOL DEL ANÍS DE LA ESPECIE *Illicium verum*

El método de extracción del aceite esencial de anís estrellado se realizó mediante una destilación simple (Le Fevre, 2000), debido a las ventajas que presenta sobre otras técnicas como destilación por arrastre de vapor y Soxhlet. La purificación del anetol obtenido a partir del aceite esencial se realizó por

cromatografía de columna y su identificación por cromatografía de capa fina al emplear como estándar de anetol 99.99% de marca Merck®. Al revelar la placa con ácido fosfomolibdico al 20% en etanol se observaron manchas en color azul oscuro correspondientes al anetol. Para caracterización experimental del compuesto se empleó el espectrofotómetro *Perkin Elmer Spectrum BX IR-TF*® modelo 75779.

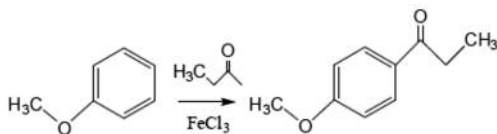


SÍNTESIS DEL *TRANS*-ANETOL

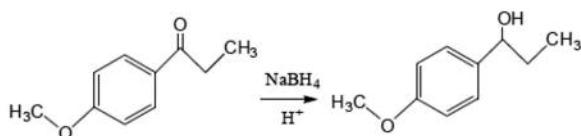
Para la obtención de anetol sintético, se realizó una reacción selectiva de anisol y cloruro de propionilo (Grove *et al.* 2006). La reacción consta de tres etapas, en la primera, el anisol es convertido en 4-metoxipropiofenona por una acilación de Friedel-Crafts. En el si-

guiente paso, el grupo cetónico se reduce al alcohol correspondiente con borohidruro de sodio (NaBH_4). Finalmente, el 1-(4-metoxifenil)-1-propanol es deshidratado en presencia de una catálisis ácida con sulfato ácido de potasio (KHSO_4) y convertido en anetol (ver Esquema 1).

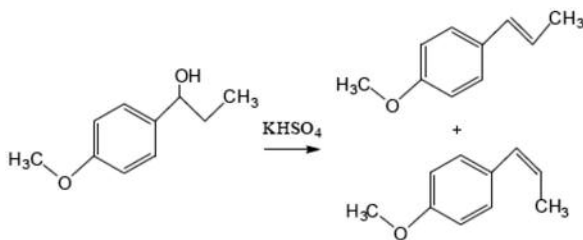
Etapa 1



Etapa 2



Etapa 3



Esquema 1. Preparación del anetol sintético

MODELAMIENTO COMPUTACIONAL

Se empleó el software *Gaussian 03* para la optimización de las geometrías de las moléculas que intervinieron en el proceso de síntesis química realizado a nivel de laboratorio. Con los valores de energía Hartree Fock (HF)

mediante el uso del funcional híbrido B3LYP y la base 6-31G (d), se observó el perfil energético de la reacción. Posteriormente las frecuencias de vibración molecular se visualizaron con el programa *GaussView 3.09*. Y, finalmente se obtuvieron los espectros infrarrojos teóricos del *cis* y *trans* anetol.

RESULTADOS

El rendimiento del aceite esencial extraído del anís estrellado fue del 2.18%. En la Tabla 2, se indica que el resultado promedio de anetol natural presente en las muestras analizadas fue del 1.44%. Las propiedades físicas y químicas del anetol se muestran en la Tabla 3. Por espectroscopia infrarroja se determinó que el isómero geométrico presente en el aceite esencial es 100% *trans*-anetol.

Tabla 2: Rendimiento de anetol obtenido

Muestra	% <i>trans</i> -anetol
Sin marca	1.39
"Doña Petrona"	1.33
"El Aroma"	1.11
"El Sabor"	1.61
"Mc Cormick"	1.78
χ	1.44
σ	0.16

Tabla 3: Propiedades físicas y químicas

Valores experimentales	
Aspecto	Cristales
Color	Transparente-blanquecino
Olor	Anisado
Sabor	Picante
Punto de fusión	22.55 °C
Solubilidad	Diclorometano, hexano

El rendimiento de la reacción de síntesis química realizada en el laboratorio fue del 58.18%, del cual el 81.45% corresponde a *trans*-anetol y 18.55% de *cis*-anetol. El análisis espectroscópico confirmó la presencia de los dos tipos de isómeros en el producto obtenido.

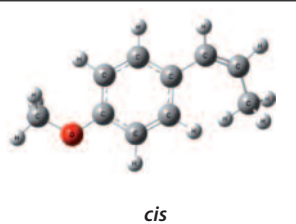
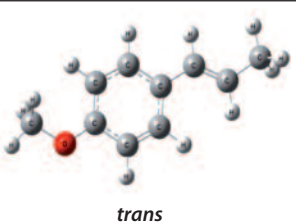
En cuanto al modelamiento computacional, los resultados indicaron que la energía potencial se incrementa mientras las moléculas reaccionan en-



tre sí, alcanzan un máximo y los átomos se reacomodan para formar los enlaces químicos característicos de los productos que finalmente se obtienen. Al comparar la energía de los isómeros *cis* y *trans*, se observó una diferencia energé-

tica de 2.63 kcal/mol, resultado que concuerda con cálculos realizados por Grove y colaboradores a nivel de MM (Molecular mechanics) y AM1 (Austin Model 1) como se puede apreciar en la Tabla 4.

Tabla 4: Diferencia energética entre el *cis* y *trans* anetol

	 <i>cis</i>	 <i>trans</i>	<i>cis-trans</i>
MM	26.36	24.17	2.19 kcal
AM1	-7.66	-9.32	1.66 kcal
HF	-460.50	-463.13	2.63 kcal

IV DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La determinación estructural del anetol natural y sintético se realizó por comparación con el espectro infrarrojo (IR) del estándar de anetol. Al comparar los espectros IR experimentales con los teóricos mostrados en la Tabla 5, se observó una correlación muy similar entre los picos característicos. La mínima diferencia se debe, a que las moléculas modeladas computacionalmente se optimizan en fase gaseosa.

La presencia del isómero *trans* se muestra en la frecuencia 25 con su banda característica a 962.28 cm^{-1} , que es similar a la longitud de onda indicada en los espectros IR del *trans*-anetol natural y sintético. Los picos a 963 y 837.23 cm^{-1} corresponden a enlaces C-H (torsión), que confirman la presencia de un *trans*-alqueno y un enlace doble *para*-disustituido. Para el isómero *cis*-anetol, se observó en la frecuencia 23 una

banda característica a 939.178 cm^{-1} , semejante a la longitud de onda del espectro IR del anetol sintético.

Tabla 5: Comparación de bandas de los espectros experimentales y teóricos del anetol natural, sintético y computacional

	<i>cis</i> cm^{-1}	<i>trans</i> cm^{-1}	Enlace C-H	Enlace C-O-C
Espectro del estándar	-	963.09	Aromático: 3022.42 Alifático: 2911.63	Asimétrico: 1282.09 Simétrico: 1033.34
Espectro anetol natural	-	963.00	Aromático: 3022.41 Alifático: 2911.77	Asimétrico: 1282.13 Simétrico: 1034.00
Espectro anetol sintético	930.22	962.78	Aromático: 3022.13 Alifático: 2928.53	Asimétrico: 1282.22 Simétrico: 1034.58
Espectro teórico	939.18	962.28	Aromático <i>cis</i> : 3056.71 Aromático <i>trans</i> : 3044.90 Alifático <i>cis</i> : 3000.57 Alifático <i>trans</i> : 3000.36	Asimétrico <i>cis</i> : 1291.39 Asimétrico <i>trans</i> : 1276.39 Simétrico <i>cis</i> : 1025.83 Simétrico <i>trans</i> : 1024.88

Los espectros IR teóricos del *cis*-anetol y *trans*-anetol se muestran en las Figuras 2 y 3 respectivamente. El número de modos vibracionales está dado por la expresión $3n-6$, donde

$n=23$ es el número de átomos de la molécula ($\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}$), que dan como resultado 63 modos vibracionales para el anetol, que es exactamente el número de bandas que presentan los espectros.

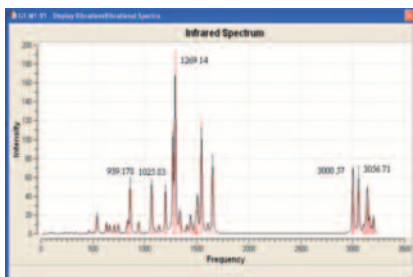


Figura 2: Espectro IR teórico *cis*-anetol

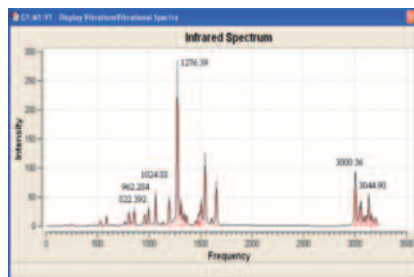


Figura 3: Espectro IR teórico *trans*-anetol

V CONCLUSIONES

Se concluyó mediante un análisis espectroscópico infrarrojo experimental y teórico, que el anetol natural corresponde al isómero geométrico *trans* y el anetol sintético a las formas *cis* y *trans*.

De acuerdo con el modelamiento computacional realizado, la diferencia energética entre los isómeros *cis* y *trans* fue de 2.63 kcal/mol, con lo

cual se demuestra que el *trans*-anetol es un producto químicamente estable; de esta manera, se explica porqué en la naturaleza se produce en un 99%.

Se demostró que el método que produce mayor cantidad de *trans*-anetol se obtiene por procesos sintéticos; sin embargo la separación isomérica y el costo son sus principales desventajas.

AGRADECIMIENTO

A la Lic. Carlota Córdova y al Lic. Ramiro Merino por la revisión final de este estudio.

LITERATURA CITADA

- Frisch, E. & Foresman, F. (1996). *Exploring chemistry with electronic structure methods* (2a. ed.). Pittsburgh, USA: Gaussian Inc.
- Grove, T., DiLella, D. & Volker, E. (2006). Stereospecific Synthesis of the Geometrical Isomers of a Natural Product. *Journal of Chemical Education*, 83 (7), 1055.
- Le Fevre, J. (2000). Isolating trans-Anethole from Anise Seeds and Elucidating, Its Structure: A Project Utilizing One- and Two-Dimensional NMR Spectrometry. *Journal of Chemical Education*, 77 (3), 361.
- Ryu, J., Seo, J., Lee, Y., Lim, Y., Ahn, J. & Hur, H. (2005). Identification of *syn*- and *anti*-anethole-2,3-epoxides in the metabolism of *trans*-anethole by the newly isolated bacterium *Pseudomonas putida* JYR-1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (15), 5954-5958.

**PERFIL LIPÍDICO
Y CONTENIDO DE ACIDOS
GRASOS TRANS EN PRODUCTOS
ECUATORIANOS DE MAYOR
CONSUMO**

**LIPID PROFILE AND CONTENT IN TRANS FATTY
ACID OF GREATER CONSUMER PRODUCTS
ECUADORIANS**

**PABLO LÓPEZ PROAÑO
PABLO POZO PANTOJA
ANDREA GUZMÁN**

*Recibido 26 de marzo de 2012
Aceptado 9 de abril de 2012*



PERFIL LIPÍDICO Y CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS TRANS EN PRODUCTOS ECUATORIANOS DE MAYOR CONSUMO

Pablo López Proaño¹, Pablo Pozo Pantoja², Andrea Guzmán³

PALABRAS CLAVES: grasas saturadas, grasas trans, extracción, cromatografía de gases

KEY WORDS: saturated fat, trans fat, extraction, gas chromatography

RESUMEN

Ecuador experimenta un cambio significativo en la costumbre de alimentación de su población, caracterizado por una oferta casi ilimitada de alimentos de alta densidad energética a muy bajo costo pero con poco aporte de minerales y vitaminas. Este nuevo hábito de alimentación, reconocido como transición nutricional, trae como consecuencia el apareamiento de una serie de enfermedades relacionadas

con la dieta, entre las cuales sobresalen la obesidad, la diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer. El propósito del presente estudio fue determinar el contenido de ácidos grasos en los alimentos procesados que más habitualmente consumen jóvenes residentes en la ciudad de Quito. Se estudiaron ocho variedades de alimentos que mayormente consumen jóvenes universitarios de la ciudad de Quito, de entre 20 a 25 años de edad: aceites comestibles, margarinas,

1 Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Enfermería, Carrera de Nutrición Humana (pelopez@puce.edu.ec).

2 Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Escuela de Ciencias Químicas (pepozo@puce.edu.ec).

3 Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Enfermería, Carrera de Nutrición Humana (andregf_24@hotmail.com).

galletas simples, galletas con relleno, galletas con cobertura, productos de pastelería, "snacks" y papas fritas, que se expenden tanto en cadenas de comidas rápidas transnacionales, como aquellas que se venden en restaurantes locales. Se determinó el contenido lipídico por el método de extracción de grasas saponificables y el perfil de ácidos grasos se lo estableció por el método de cromatografía de gases AOCS Ce-1h-05. Los datos del estudio señalan que el contenido de ácidos grasos saturados es alto en los productos preenvasados que se consumen habitualmente. El contenido de AGTrans no muestra cantidades significativas, excepto en galletas, especialmente las rellenas y que tienen cobertura de chocolate. Los productos en términos generales muestran un desbalance significativo en la relación omega 6 : omega 3, siendo más manifiesto en los aceites comestibles. Los productos analizados muestran importantes concentraciones de AGSaturados en su composición, casi nulo aporte de ácidos grasos omega-3, razón por la cual se nota un desbalance en el contenido lipídico que podría favorecer la presencia de enfermedades cardiovasculares en la población.

ABSTRACT

Ecuador is experiencing a significant change in the habit of power of its population, characterized by an almost unlimited supply of food with a high energy density at a very low cost, but with low supply of minerals and vitamins. For the purpose of simplifying the tasks, including the preparation of meals, the industry has been made available to the market a series of differentiated products that are characterized by being high in calories, especially fats and simple sugars, to the detriment of the preparation of more elaborated meals and traditional. It is now possible to produce meals with an almost unlimited combination of flavors, quality and texture. In fact, the handling of the characteristics of the food, makes it difficult for consumers associate the amount of food with its energy content and even worse with the type and quantity of the nutrient present in the food. This new eating habit, recognized as nutrition transition, results in the appearance of a number of diet-related diseases, among which obesity, type 2 diabetes, cardiovascular disease and certain types of cancer. In a concrete way it has blamed the AGSaturates saturated fatty acids and fatty acids to the trans configuration (TFA), as the direct responsibility of this diseases. Objective:



the aim of the present study was to investigate the content of fatty acids in processed foods that most commonly consumed by young people who reside in the city of Quito, and in this way raise the best strategies to reduce its availability and curb the massive consumption of this type of products. We studied eight varieties of food: edible oils, margarines, crackers, cookies with filling, covered biscuits, pastries, snacks and chips that are sold both in transnational fast food chains, such as those that sold in local restaurants, lipid content was determined by the method of extraction of saponifiable fat and fatty acid profile was established by gas chromatographic method AOCS Ce-1h-05. The survey data indicate that the

content of saturated fatty acids is high in the packaged products that are consumed regularly. The content of TFA does not show significant quantities, except in crackers, especially the stuffed and those that have coverage of chocolate. The products generally show alterations in the relationship omega 6 : omega 3, being more overt, as would be expected in the edible oils. The industrialized products show significant concentrations of AGSaturates. On the other hand, the products analyzed do not show significant contributions of omega-3 fatty acids, which is why we note an imbalance in the lipid content that could promote the presence of cardiovascular disease in the population.

INTRODUCCIÓN

A pesar que las grasas suelen ser señaladas como sustancias peligrosas para la salud, estas cumplen roles fundamentales para el buen funcionamiento del organismo: estructura de las membranas celulares, síntesis de los derivados eicosanoides, transportadores de vitaminas liposolubles, proporcionan sabor a las comidas y junto con las proteínas, proveen sensación de plenitud (Yépez, 2004, Mataix, 2005, Calder, 2008). Los ácidos grasos esenciales de

la familia omega-3, entre ellos el docosahexaenoico (DHA) y eicosapentaenoico (EPA), contribuyen para el desarrollo del sistema nervioso, la integridad visual fetal y proveen un efecto cardioprotector (Simopoulos, 2001), (Noticias OPS/OMS. Oncología., 2005). Por su lado, el exceso de grasas saturadas en las comidas (AGSat), presentes especialmente en mantecas animales y aceites tropicales, como el de palma, se hallan involucradas en la etiopatogenia de la

formación de la placa de ateroma y por consiguiente de la enfermedad cerebro-vascular (Ramírez, et al., 2010), (Bruce, et al., 2004). Se calcula que en el 2004 murieron por enfermedades cardiovasculares (ECV) 17.3 millones de personas, lo cual representa un 30% de todas las muertes registradas en el mundo; 7.3 millones de esas muertes se debieron a la cardiopatía coronaria y 6.2 millones a los accidentes cerebro vasculares (ACV). Además, se calcula que en el 2030 morirán cerca de 23.6 millones de personas por ECV, sobre todo por cardiopatías y ACV y se prevé que sigan siendo la principal causa de muerte (OMS, 2011).

La hidrogenación parcial de aceites vegetales y la obtención de margarinas y mantecas vegetales, permitieron su amplia utilización en panadería, repostería, galletería, además para la preparación de papas fritas, maíz reventado, alimentos congelados, aderezos para ensaladas, potajes y caramelos (Uauy, et al., 2009), (Valenzuela, 2008). Varios estudios han demostrado que estos productos contienen importantes concentraciones de ácidos grasos trans (AGTrans) (Chulich, et al., 2005), (Peterson, et al., 2006), (Fernández, et al., 2010), (Griguol, et al., 2003), isómeros involucrados en la génesis de dislipidemias (Mozaffarian, et al., 2006), disfunción endotelial (Castro-Mar-

tínez, 2010), aumento de la actividad inflamatoria y oxidativa, arteriosclerosis acelerada (Hunter, et al., 2010) y un aumento muy significativo de la morbimortalidad cardiovascular (Mozaffarian, et al., 2009). Efectivamente, la ingesta de ácidos grasos trans (AGTrans), muestran un efecto claro en la elevación de la fracción LDL-colesterol, disminución de la concentración plasmática de HDL-colesterol (Mozaffarian & Clarke, 2009), parecen ciertamente participar en la formación de apolipoproteína (a), activación del factor de coagulación VI, todos ellos factores de riesgo asociados con la génesis de la enfermedad coronaria (Almeida, et al., 2009). La evidencia con que se cuenta, señala claramente una relación positiva entre el consumo de AGTrans y el apareamiento de las enfermedades antes mencionadas, razón por la cual varios gobiernos en el mundo, han decidido tomar medidas tendientes a disminuir o eliminar el contenido de AGTrans en los alimentos (OPS, 2008). Acorde con estas medidas, ciertos sectores de la industria alimentaria de manera voluntaria, se proponen emplear mejores materias primas para la elaboración de sus productos, así como incorporar procesos tecnológicos para la elaboración de aceites y margarinas libres de AGTrans y remplazándolas por mono y polinsaturados de forma CIS (Monroy, 2009), (Valenzuela, 2008).



Las estrategias más económicas y que muestran un efecto eficaz en la prevención y control de las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) son aquellas intervenciones de tipo ambiental y multisectorial. Por ejemplo, se ha demostrado que el remplazo de los AGTrans con grasas no saturadas, reduciría las enfermedades cardiovasculares y diabetes entre 7 y 40% respectivamente con un costo de intervención que no supera \$0.50 por persona por año; la legislación y la educación sanitaria para reducir el colesterol tiene un costo de \$135 por persona por año; mientras que las medidas que apuntan

a la adopción de terapias individuales pueden superar los \$ 1200 por persona por año (OPS/OMS, 2007).

En el Ecuador no existe información sobre el contenido de ácidos grasos en los principales alimentos de consumo; tampoco se han establecido regulaciones sobre su contenido basadas en información cierta. Con estos antecedentes el presente estudio aporta a este conocimiento, lo cual permite proponer estrategias tendientes a mejorar la disponibilidad y consumo de alimentos con grasas más saludables.

II MUESTREO

Se escogieron estudiantes universitarios pertenecientes a instituciones de educación superior que reciben al mayor número de alumnos en la ciudad de Quito. Las universidades seleccionadas fueron dos públicas y dos privadas con el propósito de tener representatividad de los diferentes estratos socio-económicos de la ciudad. El total de encuestados fue de 283; de estos, 103 hombres (36.4%) y 180 mujeres (63.6%). El promedio de edad de los encuestados fue de 21 años \pm 1.18. A los participantes se les aplicó una encuesta para obtener información sobre

los productos que ellos consumían habitualmente y sobre el lugar donde los adquirirían. Se consideraron ocho variedades de alimentos procesados, elegidos por su contenido importante graso, grasas saturadas y grasas Trans, de acuerdo con varios estudios previos en la región (OPS, 2008). De cada grupo de alimentos se pidió señalar la marca o nombre comercial del producto y el lugar de compra. Se escogieron los tres productos de mayor consumo de cada grupo de alimentos, se los compró, en cinco establecimientos ubicados en diferentes sectores de la ciudad. De esta

manera se adquirieron 5 unidades de cada variedad de alimentos; las unidades fueron similares, es decir tenían el mismo peso, presentación, envase, pero de diferente lote de producción. Las variedades de productos fueron: aceites comestibles, margarinas, galletas simples, galletas con relleno, galletas con cobertura, productos de pastelería,

“snacks” y papas fritas que se expenden tanto en cadenas transnacionales de comida rápida, como aquellas que se venden en restaurantes locales. Las muestras fueron llevadas al laboratorio y permanecieron en sus envases originales hasta el procesamiento respectivo.

III METODOLOGÍA DE ANÁLISIS

Las cinco muestras adquiridas de cada producto, se homogenizaron mecánicamente mediante el uso de un procesador de alimentos; en el caso de los aceites simplemente se mezclaron en un recipiente para homogenizarlos y para las margarinas fue necesario llevarlas a baño María para luego mezclarlas. Una vez homogenizada la muestra se tomó una pequeña porción y se pesó 0.13 g de muestra homogenizada en un vial. Se añadió al vial con la muestra, 2.5 ml de solución de KOH 0.5 M en metanol, para formar las respectivas sales de ácidos grasos por el proceso de saponificación, se tapó el vial y se colocó en el baño María por 10 minutos a temperatura de ebullición del agua para que la saponificación sea completa. Se sacó el vial del baño María, se lo secó y dejó enfriar, al cabo de lo cual

se le agregó 1 ml de solución de HCl en metanol (1:4) v/v para regenerar los ácidos grasos y la formación de KCl; el vial con tapa nuevamente se calentó a baño María por 25 minutos a una temperatura de 50°C para asegurarse que la reacción fue completa. Al vial se lo dejó enfriar y se le añadieron 5 ml de agua destilada con la finalidad de formar 2 fases: la acuosa que contiene KCl y la orgánica que contiene los ácidos grasos libres. Se procedió a la extracción de la fase orgánica por tres ocasiones con la utilización para el efecto de 5 ml de éter de petróleo por cada extracción, mediante una pipeta Pasteur. Se trasladó el extracto etéreo a un nuevo tubo con tapa y se lo almacenó en refrigeración hasta el día en que se realizó la lectura en cromatografía de gases CG por el método AOCS Ce-1h-05.



IV RESULTADOS

Los aceites muestran niveles de AGTrans que no superan el 1% de su composición lipídica. El contenido de AGSaturados representa aproximadamente una quinta parte del contenido graso de los aceites analizados. En términos generales existe una proporción

baja de ácidos grasos omega 3 en los aceites, especialmente en el aceite a base de girasol, de esta manera, la relación omega 6 : omega 3 es muy elevada a expensas del bajo aporte de omega 3 en este aceite comestible, Tabla 1.

Tabla 1: Composición de ácidos grasos en los aceites comestibles más consumidos por estudiantes universitarios de la ciudad de Quito: aceite mezcla de palma y soya, aceite de girasol, aceite mezcla de oleínas de palma y soya (en porcentaje)

Tipo de Carboxilato		Aceite mezcla de palma y soya	Aceite de girasol	Aceite mezcla de oleínas de palma y soya
C16:0	Palmitico	15,21	6,03	19,15
C18:0	Estearico	3,78	4,25	3,68
C20:0	Araquídico	0,22	0,15	0,22
C22:0	Behénico	0,21	0,61	0,14
C24:0	Lignocérico	—	0,13	—
Total Saturados		19,42	11,17	23,19
C18:1 (n-9)	Oleico	27,61	29,00	33,38
C18:1 (n-7)	Vaccénico	0,41	0,12	0,33
C20:1(n-9/n-11)	Gadoleico	0,1	0,1	0,0
Total Monoinsaturados		28,08	29,20	33,75
C18:2 tt		0,18	0,46	0,12
C18:2 tc		0,19	0,43	0,13
C18:2 (n-6)	Linoleico	47,54	58,47	39,38
C18:3 ttc		0,26	—	0,16
C18:3 tcc		0,29	—	—
C18:3 (n-3)	Linolénico	4,04	0,27	3,28
Total Polinsaturados		52,5	59,6	43,1
% Trans		0,92	0,89	0,40
Σ Insat cis		79,19	87,74	76,04
Σ Sat + Trans		20,34	12,06	23,59
Σ Sat + Trans – C18:0		16,56	7,81	19,91
Σ Sat + Trans – C18:0/ Σ Insat cis		0,20	0,08	0,26
Relación n6/n3		11,78	213,38	12,02

Las margarinas seleccionadas son comercializadas, en el caso de dos de ellas como “suaves” y la restante como “light”. El análisis de su composición indica que estos productos superan el 40% de su contenido por AGSaturados, siendo el ácido palmítico el principal contribuyente a la cantidad de AGSaturados. El contenido de AG-Trans es superior en la margarina identificada como “light”, pero en términos generales no superan 1% de su composición. El contenido de AG de la familia n-3 es bajo, sin que en ningún caso lleguen a superar el 2% de su composición. La proporción de AG polinsaturados aporta una tercera parte aproximadamente del contenido lipídico de las margarinas, siendo el ácido linoleico su principal contribuyente. Así, la relación omega-6; omega-3 es alta en las margarinas analizadas y muestra un desbalance marcado entre las familias de estos ácidos grasos, Tabla 2.

En la categoría de productos denominados como “snacks” y de pastelería, que fueron señalados como los más consumidos, el porcentaje graso en estos productos proviene preferentemente de los AGSaturados que superan la mitad de su composición. En el caso de las pastas también conocidas como pasteles, presentan cantidades significativas de ácido palmítico, seguido de

ácido esteárico. Aproximadamente, una tercera parte de la composición de los productos es proporcionada por grasas monoinsaturadas, especialmente a base de ácido oleico. El aporte de AGPolinsaturados es bajo y el de ácidos de la familia de los omega-3 prácticamente nulo. Los productos de pastelería a base de masa de hojaldre como las “milhojas”, son las de mayor contenido de AGTrans, concretamente de ácido eláidico, que superan el 2% de su composición, Tabla 3. Los productos reconocidos como “poncakes” presentan un contenido de AGTrans por encima del 1%, Tabla 3.

El contenido de AG en papas fritas difiere marcadamente de los diferentes lugares de comida rápida seleccionados. Una de las tres muestras obtenidas en cadenas de comida rápida transnacional revela niveles de AGSaturados, especialmente ácido palmítico, por encima de la mitad de su composición. Solo uno de estos locales muestra positivamente un aporte significativo de AGMonoinsaturados en su contenido, a expensas de ácido oleico (51.5%). Predomina en las papas fritas elaboradas en sitios de comida rápida de producción local, la concentración de AGSaturados, en la cual una tercera parte de su composición se halla formada por AGMonoinsaturados, Tabla 4. En el grupo de las grasas utilizadas para



frituras, solo una de las seis cadenas estudiadas, tiene un perfil lipídico que guarda consistencia con recomendaciones internacionales acerca de los lípidos en estas preparaciones. De manera llamativa no se reporta contenido de AGTrans en todas las muestras de papas fritas, Tabla 4.

Tabla 2: Composición de ácidos grasos en las margarinas más consumidas por estudiantes universitarios de la ciudad de Quito: suave, "light"

Tipo de Carboxilato		Margarina suave 1	Margarina "light"	Margarina suave 2
		%	%	%
C8:0	Caprílico	—	0,55	0,29
C10:0	Cáprico	—	0,47	0,20
C12:0	Láurico	13,36	11,01	5,29
C14:0	Mirístico	3,23	2,80	2,04
C16:0	Palmítico	19,38	20,63	34,24
C18:0	Esteárico	7,08	8,57	5,12
C20:0	Araquídico	—	0,11	0,12
Total Saturados		43,04	44,13	47,31
C18:1 (n-9)	Oleico	24,34	23,98	37,81
C18:1 (n-7)	Vaccénico	—	0,19	0,06
C20:1 (n-9/n-11)	Gadoleico*	—	0,1	—
Total Monoinsaturados		24,34	24,22	37,87
C18:2 tt		—	0,10	0,07
C18:2 tc		—	0,12	0,12
C18:2 (n-6) Linoleico 30,92		29,17	14,15	
C18:3 ttc		—	0,16	—
C18:3 tcc		—	0,17	—
C18:3 (n-3) Linolénico 1,70		1,93	0,49	
Total Polinsaturados		32,6	31,7	14,8 %
Trans		0,00	0,55	0,19
Σ Insat cis		56,96	55,08	52,45
Σ Sat + Trans		43,04	44,68	47,50
Σ Sat + Trans – C18:0		35,96	42,38	
Σ Sat + Trans – C18:0 / Σ Insat cis		0,63	0,65	0,80
Relación n6/n3		18,19	15,15	29,11

Tabla 3: Composición de ácidos grasos en “snacks” y productos de pastelería más consumidos por estudiantes universitarios de la ciudad de Quito (en porcentaje)

Tipo de Carboxilato		Papas fritas empacadas	“Snacks” de maíz	Chifles empacados	Pastas	“Poncakes”	“Milhojas”
C8:0	Caprílico	—	—	—	1,58	0,92	0,39
C10:0	Cáprico	—	—	—	0,78	1,50	0,72
C12:0	Láurico	0,30	0,52	0,64	5,82	1,69	2,22
C14:0	Mirístico	0,80	1,11	0,99	4,43	1,81	3,01
C16:0	Palmítico	41,55	39,41	40,24	30,28	34,13	37,99
C18:0	Esteárico	8,74	9,94	8,13	21,37	17,09	10,69
C20:0	Araquídico	0,32	0,44	0,33	0,57	0,57	0,37
C22:0	Behénico	—	—	—	—	0,52	0,26
Total Saturados		51,71	51,41	50,33	64,82	58,23	55,64
C16:1 (n-7)	Palmitoleico	—	—	—	0,3	1,2	0,4
C17:1		—	—	—	0,40	0,85	0,42
C18:1 t	Eláidico	—	—	—	—	—	1,65
C18:1 (n-9)	Oleico	37,49	35,04	39,63	22,89	27,43	29,74
C18:1 (n-7)	Vaccénico	0,40	0,46	0,46	0,46	0,39	0,50
C20:1(n-9/n-11)	Gadoleico*	—	0,1	—	0,6	0,5	0,4
Total Monoinsaturados		37,90	35,61	40,09	24,71	30,35	33,19
C18:2 tt		0,16	—	—	—	0,49	0,34
C18:2 tc		0,17	—	—	—	0,88	0,18
C18:2 (n-6)	Linoleico	10,08	12,81	9,58	10,13	9,43	10,39
C18:3 (n-3)	Linolénico	—	0,17	—	0,34	0,61	0,26
Total Polinsaturados		10,4	13,0	9,6	10,5	11,4	11,2
% Trans		0,32	0,00	0,00	0,00	1,37	2,17
Σ Insat cis		47,57	48,02	49,21	33,36	37,47	40,39
Σ Sat + Trans		52,03	51,41	50,33	64,82	59,61	57,81
Σ Sat + Trans - C18:0		43,29	41,47	42,20	43,45	42,52	47,12
Σ Sat + Trans - C18:0/							
Σ Insat cis		0,91	0,86	0,85	1,30	1,13	1,16
Relación n6/n3		—	75,78	—	30,16	15,43	40,76



Tabla 4. Composición de ácidos grasos en papas fritas de locales transnacionales y nacionales más consumidas por estudiantes universitarios de la ciudad de Quito (en porcentaje)

Tipo de Carboxilato		Trans-	Trans-	Trans-	Nacionales	Nacionales	Nacionales
		nacionales	nacionales	nacionales	A	B	C
		A	B	C			
C12:0	Láurico	3,87	1,87	1,04	2,28	—	2,86
C14:0	Mirístico	2,89	1,35	1,67	1,79	—	3,53
C16:0	Palmitico	38,83	13,79	21,77	26,91	33,81	37,76
C17:0	Margárico	—	—	—	—	—	—
C18:0	Estearico	11,14	9,64	12,66	14,16	12,42	16,82
C20:0	Araquídico	—	0,36	0,54	—	—	—
C22:0	Behénico	—	0,64	1,04	—	—	—
Total Saturados		56,73	27,65	38,72	45,14	46,23	60,97
C18:1 (n-9)	Oleico	32,81	51,51	30,31	29,05	34,51	29,79
C18:1 (n-7)	Vaccénico	—	1,59	1,24	—	—	—
C20:1 (n-9/n-11)	Gadoléico*	—	0,3	—	—	—	—
Total Monoinsaturados		32,81	53,35	31,55	29,05	34,51	29,79
C18:2 (n-6)	Linoleico	10,46	17,77	28,33	24,43	19,26	9,24
C18:3 (n-3)	Linoléico	—	1,23	1,41	1,38	—	—
Total Polinsaturados		10,5	19,0	29,7	25,8	19,3	9,2
% Trans		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Σ Insat cis		43,27	70,51	60,05	54,86	53,77	39,03
Σ Sat + trans		56,73	27,65	38,72	45,14	46,23	60,97
Σ Sat + trans - C18:0		45,59	18,01	26,06	30,98	33,81	44,15
Σ Sat + trans C18:0/							
Σ Insat cis		1,05	0,25	0,43	0,56	0,62	1,13
Relación n6/n3		—	14,47	20,12	17,68	—	—

papas fritas, Tabla 4.

Entre las galletas simples, aquellas que tienen chispas de chocolate, son las que muestran niveles elevados de AGSaturados, presencia de AGTrans (ácido eláidico) en propor-

nes que superan el 2% y bajo nivel de AGPolinsaturados. Las galletas simples de sal difieren en su composición. Una de las marcas analizadas guarda una proporción bastante equilibrada entre los diferentes AG, mientras que de otro

fabricante muestran un adecuado aporte de AGMonoinsaturados (ácido oleico), no tienen presencia de AGTrans pero conservan reducido aporte de omega-6 en dos de las marcas analizadas, entre 9 y 13% y casi nulo de

Tabla 5. Composición de ácidos grasos en galletas simples más consumidas por estudiantes universitarios de la ciudad de Quito
(en porcentaje)

Tipo de Carboxilato		Simples con chispas de chocolate	Simples de sal A	Simples de sal B
C12:0	Láurico	4,62	—	0,55
C14:0	Mirístico	2,85	—	0,96
C16:0	Palmítico	33,89	27,48	26,69
C18:0	Esteárico	11,46	7,01	12,56
C20:0	Araquídico	0,51	0,42	0,31
C22:0	Behénico	0,31	—	0,28
C24:0	Lignocérico	0,22	—	—
Total Saturados		55,23	34,91	41,34
C17:1		0,36	—	—
C18:1 t	Elaídico	1,68	—	—
C18:1 (n-9)	Oleico	32,20	30,78	44,40
C18:1 (n-7)	Vaccénico	0,38	0,74	0,53
C20:1 (n-9/n-11)	Gadoleico*	0,1	0,2	0,2
C22:1 (n-9/n-11)	Erúcico	—	—	—
Total Monoinsaturados		34,73	31,69	45,13
C18:2 tt		0,32	0,41	—
C18:2 tc		0,28	0,43	—
C18:2 (n-6)	Linoleico	9,22	29,45	13,28
C18:3 ttc		—	0,30	—
C18:3 tcc		—	0,36	—
C18:3 (n-3)	Linolénico	0,21	2,45	0,25
Total Polinsaturados		10,0	33,4	13,5
% Trans		2,28	1,50	0,00
Σ Insat cis		41,63	62,68	57,93
Σ Sat + Trans		57,51	36,41	41,34
Σ Sat + Trans – C18:0		46,05	29,40	28,78
Σ Sat + Trans – C18:0/ Σ Insat cis		1,10	0,46	0,49
Relación n6/n3		43,30	12,03	53,77

* Galletas que no tienen relleno ni cobertura de chocolate



El contenido de AGSaturados en galletas rellenas y/o con cobertura de chocolate indican una proporción que va entre 46 al 59%; no obstante, el ácido esteárico aporta entre el 9 y 14% a este componente. Por su lado, el contenido de AGMonoinsaturados fluctúa entre

31 y 41%. Los niveles de omega-6 ocupan tan solo entre 6 y 11% y los de omega-3 son casi inexistentes, Tabla 6. En términos generales el aporte de AG-Trans no es significativo en las galletas analizadas, Tabla 6.

Tabla 6: Composición de ácidos grasos en galletas con relleno y cobertura más consumidos por estudiantes universitarios de la ciudad de Quito
(en porcentaje)

Tipo de Carboxilato		De chocolate con relleno de vainilla	Tipo "waffle" con relleno de vainilla	Con relleno de fresa	Con cobertura de chocolate	Tipo "waffle" con cobertura de chocolate
C8:0	Caprílico	—	—	—	0,85	1,10
C10:0	Cáprico	—	—	—	0,89	1,00
C12:0	Láurico	0,22	0,83	0,74	4,97	4,30
C14:0	Mirístico	0,71	1,37	1,25	3,67	3,10
C16:0	Palmitico	34,92	40,61	40,90	31,46	33,56
C18:0	Esteárico	9,92	9,21	10,10	15,27	14,83
C20:0	Araquídico	0,49	0,37	0,53	0,66	0,68
C22:0	Behénico	0,17	0,53	—	1,13	1,27
Total Saturados		46,43	52,93	53,53	58,90	59,84
C18:1 t	Elaídico	1,31	—	—	—	—
C18:1 (n-9)	Oleico	40,00	36,95	36,46	30,79	32,01
C18:1 (n-7)	Vaccénico	0,40	0,40	0,41	0,61	0,53
C20:1 (n-9/n-11)	Gadoleico*	0,10	—	—	—	—
Total Monoinsaturados		41,85	37,36	36,87	31,40	32,54
C18:2 tt		—	—	—	—	0,43
C18:2 tc		—	—	—	1,10	0,30
C18:2 (n-6) Linoleico		11,43	9,71	9,61	8,60	6,89
C18:3 (n-3) Linolénico		0,30	—	—	—	—
Total Polinsaturados		11,7	9,7	9,6	9,7	7,6
% Trans		1,31	0,00	0,00	1,10	0,73
Σ Insat cis		51,73	46,66	46,07	39,39	38,9
Σ Sat + Trans		47,74	52,93	53,53	60,00	60,57
Σ Sat + Trans - C18:0		37,82	43,72	43,43	44,73	45,74
Σ Sat + Trans - C18:0/ Σ Insat cis		0,73	0,93	0,94	1,13	1,17
Relación n6/n3		38,35	—	—	—	—

V DISCUSIÓN

La mortalidad por enfermedad cardiovascular en el Ecuador se encuentra en aumento. La inactividad física, el hábito de fumar y la alimentación inadecuada son, junto a la predisposición genética, los responsables de esta realidad. Entre los nutrientes que repercuten negativamente en la salud de los individuos se encuentran los ácidos grasos saturados y los insaturados de configuración trans (Nishida, R. Uauy, 2009), (Valenzuela, 2008). La evidencia científica señala que la ingesta de grasas saturadas produce mayor incremento de la colesterolemia en comparación con el efecto hipercolesterolémico del colesterol dietético. Una excepción en la familia de los AGSaturados es el ácido esteárico (18:0) que no parece promover el incremento del colesterol total o del colesterol LDL (Bonanome & Grundy, 1988). En los alimentos estudiados, la mayor concentración de AGSaturados se encuentra presente en las galletas con cobertura de chocolate en aproximadamente 59%, galletas simples con chispas de chocolate 55% y galletas con relleno 53%. Siguen los productos conocidos como "snacks" y productos de pastelería, especialmente en éstas últimas, en las cuales su cuantía fluctúa entre 55.6 a 64.8% de su composición. Una cadena de comida

rápida transnacional y otra local, presentan en sus papas fritas, niveles de AGSaturados que llegan a 56% y 60% de su composición, respectivamente.

La hidrogenación parcial de aceites vegetales empleados por la industria para la producción de grasas semisólidas, genera gran cantidad de ácidos grasos trans (AGT), y alcanza en algunos países hasta 40% de las grasas totales en los productos envasados, especialmente en margarinas, panes, galletas dulces y saladas, golosinas, barras de cereal, baños de repostería, cereales precocidos para niños (Larqué, et al., 2003), (Griguol, et al., 2007), (Tavella, et al.), (Dadán, 2005). El consumo de AGT de origen industrial, se relaciona con alteraciones del metabolismo de los lípidos sanguíneos, efecto hipercolesterolemiante (Zamorano, 2010), (Fernández, et al., 2010), (Díaz & Becerra, 2001), marcada disminución del colesterol HDL, inflamación vascular y desarrollo de enfermedades cardio y cerebro vasculares (De Luis, et al., 2005), (Granados, et al., 2006). En las muestras de los alimentos estudiadas no se aprecian niveles importantes de AGTrans. Los productos de pastelería como las "milhojas" y las galletas simples con chispas de chocolate son las que contienen niveles ligeramente por encima del 2% de su



composición. Los aceites comestibles presentan bajos niveles de ácidos grasos trans y entre las margarinas estudiadas no se hallaron valores de ácido eláídico, pero si una apreciable cantidad de AG-Saturados que oscila entre 43.0 a 47.3%. Este hallazgo puede ser entendido en el hecho de que las materias primas para la elaboración de las margarinas provienen básicamente de una mezcla de aceites vegetales con cantidades apreciables de AGSaturados, especialmente aquellos extraídos de palma. Los locales de expendio de comida rápida, tanto transnacionales como nacionales, no muestran AGTrans en la elaboración de papas fritas.

Se conoce que los AGInsaturados de configuración CIS, ácido linoleico (18:2 n-6) y el ácido oleico (18:1 n9 cis), disminuyen los niveles de colesterol plasmático (Simopoulos, 2009). En los productos estudiados, los aceites y margarinas muestran niveles de ácidos grasos omega-6 elevados. Los aceites mezcla de palma y soya presentan en su composición 39.3% de ácido linoleico y 58.4 % de aceite de girasol. Las margarinas muestran concentraciones de ácido graso linoleico con valores que van desde 14.8 hasta 32.6%. El resto de productos muestran niveles bajos de ácido graso linoleico, a excepción de una cadena de comida rápida transna-

cional que elabora papas fritas y una marca de galletas simples de sal.

Las dietas que incluyen un alto consumo de aceites monoinsaturados son tan efectivas en bajar el colesterol LDL, como aquellas ricas en polinsaturados, pero en contraste con el efecto de las dietas altas en polinsaturados omega-6, las dietas con ácidos grasos monoinsaturados no disminuyen el colesterol HDL (Perona, et al., 2007), (Sanjurjo, et al., 2008). El contenido de ácido oleico, principal AGMmonoinstaurado, se halla distribuido de manera muy regular en todos los productos analizados. Los niveles son superiores en una cadena transnacional de papas fritas, cuyos niveles llegan al 53.3% y una variedad de galleta de sal (45.1%), en el resto de productos ocupa aproximadamente una tercera parte de su composición.

El efecto beneficioso en el perfil lipídico que muestran los ácidos grasos oleico y linoleico, puede ser potenciado por el consumo de ácidos grasos de la familia n-3 provenientes de los peces (principalmente ácidos eicosapentaenoico y docosahexaenoico) y de aceites de plantas (ácido alfa linolénico n-3) con efecto protector en la enfermedad coronaria del corazón (Carrero, 2005). No obstante, dado que el sistema enzimá-

tico que transforma los dos tipos de ácidos grasos esenciales es el mismo, linoleico n-6 y linoléico n-3, existe un efecto de competencia entre ellos y por lo tanto es necesario un cierto balance en el aporte dietario de los mismos. Un exceso de ácido linoleico va a impedir, por efecto de competencia con los sistemas de elongación y desaturación, la transformación del ácido alfa linoléico en EPA y DHA. El balance recomendado debe oscilar entre 4:1 a 6:1 y cuanto más se incline la balanza en ese sentido, mayor será la mortalidad cardiovascular (López, et al., 2006), (Jakobsen, et al., 2009), (Wijendran & Hayes, 2004). En los alimentos analizados se muestra una relación desequilibrada de los ácidos grasos de la familia n-6:n-3. La desproporción es notoria en aceites comestibles como el de girasol y algunos tipos de "snacks" enfundados como los de maíz.

La Organización para Agricultura y Alimentación señala que los ácidos grasos polinsaturados totales deben representar 6-10% del total de

las grasas y particularmente los ácidos grasos n-3 deberían corresponder al 1-2% de la energía total (FAO, 2008). Los aceites comestibles analizados en cuya combinación se halla presente soya, son los que muestran cantidades de ácido linoléico que llega entre el 3 y 4% de su composición. El resto de alimentos analizados muestran en general un aporte insignificante o casi nulo de ácidos grasos omega-3. Si bien los ácidos grasos polinsaturados consumidos de manera elevada, específicamente de la familia n-6, tienen efecto hipocolesterolemizante, solo incrementan el HDL cuando la relación ácidos polinsaturados/ácidos saturados (P/S) no supera 1,5 (Hodson et al., 2001). En el caso de las muestras analizadas, los aceites a base de girasol, muestran una relación elevada P/S que llega a 5.2 y por lo tanto su consumo podría verse relacionado con un efecto negativo al disminuir HDL. En los otros aceites, mezclas de palma y soya, la relación P/S va de 2.44 a 1.65.

IV CONCLUSIONES

De los resultados de los análisis se puede observar un alto contenido de ácidos grasos saturados en los alimentos de mayor consumo en la población

universitaria de la ciudad de Quito, especialmente en galletas con chispas de chocolate, de chocolate y con cobertura de chocolate, así como también en



“poncakes” y “milhojas”. Los niveles de AGTrans no muestran cantidades significativas y su presencia supera ligeramente el 2% de la composición del producto en pastas a base de masa de hojaldre y en los aceites comestibles mezcla de palma y soya. En los aceites analizados, los producidos a base de girasol muestran cantidades elevadas de linoleico y bajas concentraciones de n-3. De esta manera, la relación n-6:n-3 no es la adecuada, con un desbalance manifiesto en el aceite de girasol, margarinas suaves, pastas tipo “milhojas” y papas fritas producidas en una cadena de comida rápida transnacional. En general, en los alimentos analizados, las cantidades de ácidos grasos de la familia n-3

son bajas. Estos datos ameritan a la brevedad posible establecer acuerdos entre los diferentes sectores: gubernamentales, privados y académicos, en aras de emprender acciones intersectoriales para normar los contenidos de ácidos grasos saturados y trans que deben contener los productos, tecnificar la producción de alimentos con alternativas que incluyan grasas insaturadas cis, incluidos los ácidos grasos polinsaturados de la familia omega-3 y monitorear mediante estudios periódicos el contenido de ácidos grasos en los alimentos, su ingesta y marcadores biológicos que indiquen el perfil lipídico en la población.

LITERATURA CITADA

- Aguilera, C., Ramírez-Tortosa, M., Mesa, M. & Gil, A. (2001). *Efectos protectores de los ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados sobre el desarrollo de la enfermedad cardiovascular*. Granada, España.
- Almeida, G., Saracho, H., Soto, A., Martínez, B., Bellido, D. & García. (2009). *Los ácidos grasos trans y su papel en nutrición*.
- Bonanome A. & Grundy S. (1988). *Effect of dietary stearic acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels*. N Engl J Med 318: 1244-1248.
- Bruce, J. Dillard, J. & Clin, J. (2004). *Saturated fats: what dietary intake*. USA. 80:550-9.
- Calder PC. (2008). *The relationship between the fatty acid composition of immune cells and their function. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2008 Sep-Nov; 79(3-5):101-8. Epub.
- Carrero, J., Bautista, E., Baró, L., Fonollá, J., Jiménez, J., Boza, J. & López, E. (2005). *Alimentos funcionales. Efectos cardiovasculares de los ácidos grasos omega-3 y alternativas para incrementar su ingesta*. Granada, España. XX (1) 63-69.
- Castro, M., Bolado, V., Landa, A., Liceaga, Soto, J. & López, J. (2010). *Dietary trans fatty acids and its metabolic implications*. Clínica de Obesidad, Departamento de Medicina Interna, Hospital General Regional 1, Instituto Mexicano del Seguro Social, México DF, México. Jul-Aug; 146(4):281-8.
- Chulich, G., León, Camacho, & Romero, M. (2005). *Contenido en Ácidos Grasos Trans de las margarinas: Evolución en las Últimas Décadas y Tendencias Actuales*. Sevilla, España.
- Dadán, S. (2005). *Los ácidos grasos trans, una amenaza constante presente en nuestra alimentación cotidiana*. Bogotá, D.C. Colombia.
- De Luis, A., Bachiller, P., Izaola, O. & Eiros Bouza, J. (2005). *Relation between intake of omega 3 fatty acids and CD4 count in patients with HIV infection: a transversal study*. Sección de Endocrinología y Nutrición Clínica, Hospital del Río Hortega, Valladolid. ul; 22(7):323-5.
- Delplanque, B., Tavella M & Peterson G. *El aceite de girasol de alto oleico y la prevención de la aterosclerosis*. Argentina.
- Díaz, M. & Becerra, L. (2001). *Relación entre el consumo de ácidos grasos trans contenidos en la margarina vegetal y los niveles de lípidos sanguíneos en individuos de Bogotá*. Bogotá, Colombia.
- Etherton, K., Taylor, D., Yu-Poth, S., Huth, P., Moriarty, K., Fishell, V., Hargrove, R. & Zhao, G. (2000). *Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States*. USA.
- FAO. (2008). *Food and nutrition paper. Fats and fatty acids in human nutrition*. Report of an expert consultation. 10-14 November, 14-17. Geneva.



Fernández, L. C., Serra J. D., Álvarez, J. R., Alberich, R. S. & Jiménez F. P. (2011). *Dietary fats and cardiovascular health*. Centro de Salud La Victoria de Acentejo, Santa Cruz de Tenerife, España. Mar; 43(3):157.e1-16.

Fernández, C., Romero, M., Fogar, R., Doval, M., Romero, A. & Judis, M. (2010). *Calidad Nutricional de productos panificados elaborados en la Provincia del Chaco República Argentina*. Chaco, Argentina.

Fernández, C., Romero, M., Fogar, R., Doval, M., Romero, A. & Judis, M. (2010). *Calidad Nutricional de productos panificados elaborados en la Provincia del Chaco República Argentina*. Chaco, Argentina.

Granados, S., Quiles, J., Gil, A. & Ramírez, M. (2006). *Dietary lipids and cancer*. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Granada, España. May;21 Suppl 2:42-52, 44-54.

Griguol, V., León, M. & Vicario, I. (2007). *Revisión de los niveles de ácidos grasos trans encontrados en distintos tipos de alimentos*. Sevilla, España.

Griguol, V., Vicario, I. & León, M. (2003). *Contenido en isómeros geométricos de los ácidos grasos en helados comerciales españoles*. España.

Griguol, V., Vicario, I. & León, M. (2003). *Contenido en isómeros geométricos de los ácidos grasos en helados comerciales españoles*. España.

Hodson, L., Skeaff, C. & Chisholm W.

(2001). *The effect of replacing dietary saturated fat with polyunsaturated or monounsaturated fat on plasma lipids in free-living young adults*. European Journal of Clinical Nutrition 55, 908-915. Dunedin, New Zealand.

Hu F., Manson J. & Willett W. (2001). *Types of Dietary Fat and Risk of Coronary Heart Disease: A Critical Review*. Journal of the American College of Nutrition, Vol. 20, No. 1, 5-19. USA.

Hunter, J., Zhang, J. & Kris, P. (2010). *Cardiovascular disease risk of dietary stearic acid compared with trans, other saturated, and unsaturated fatty acids: a systematic review*. Department of Chemistry University of Cincinnati, USA. Jan; 91(1):46-63. Epub (2009) Nov 25.

Jakobsen, M., Reilly, E., Heitmann, B., Pereira, M., Balter, K., Fraser, G., Goldbourt, U., Hallmans, G., Knekt, P., Liu, S., Pietinen, P., Spiegelman, D., Stevens, J., Virtamo, J., Willett, W. & Ascherio, A. (2009). *Major types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a pooled analysis of 11 cohort studies*. USA. 89:1425-32.

Larqué, E., Garaulet, M., Pérez, F., Zamora, S. & Tebar, F. (2003). *Fatty acid composition and nutritional relevance of most widely consumed margarines in Spain*. España.

López, S., Ausman, L., Jalbert, S., Erkila, A. & Lichtenstein, A. (2006). *Palm and partially hydrogenated soybean oils adversely alter lipoprotein profiles compared with soybean and canola oils in moderately hyperlipidemic subjects*. USA.

Mataix, J. (2005). *Nutrición y Alimen-*

tación Humana. Barcelona, España. Océano Tomo 1.

Monroy, R. (2009). *Ácidos grasos trans: riesgos a la salud y legislación mexicana*.

Mozaffarian, D., Katan, M., Ascherio, A., Stampfer, J. & Willett, W. (2006). *Trans fatty acids and cardiovascular disease*. N Engl J Med; 354:1601-1613. Massachusetts Medical Society. MA, USA.

Mozaffarian, D., Aro, A. & Willett, W. (2009). *Health effects of trans-fatty acids: experimental and observational evidence*. Boston, MA, USA.

Mozaffarian, D. & Clarke, R. (2009). *Quantitative effects on cardiovascular risk factors and coronary heart disease risk of replacing partially hydrogenated vegetable oils with other fats and oils*. Boston, MA, USA. Oxford, England.

Nishida, R. & Uauy, R. (2009). *Introduction WHO Scientific Update on health consequences of trans fatty acids*. Geneva, Switzerland, Chile, London, UK.

Noticias OPS/OMS. Oncología. (2005). *El aceite de oliva combate el cáncer de mama reduce la presencia de oncogén, según investigaciones médicas*.

OMS. (septiembre-2011). Nota informativa.

OPS/OMS. (2007). *Estrategia Regional y Plan de Acción para un enfoque integrado sobre la prevención y el control de las Enfermedades Crónicas*.

Organización Panamericana de la Salud. (2008). *Aceites saludables y la eliminación de ácidos grasos trans de origen industrial en las Américas: iniciativa para la prevención de enfermedades crónicas*. Washington, D.C.

Perona, J., Avella, M., Botham, K. & Ruiz, V. (2007). *Differential modulation of hepatic very low-density lipoprotein secretion by triacylglycerol-rich lipoproteins derived from different oleic-acid rich dietary oils*. Sevilla, España; Londres, Reino Unido.

Peterson, G., Aguilar, D., Espeche, M., Mesa, M., Jáuregui, P., Díaz, H., Simi, M. & Tavello, M. (2006). *Ácidos grasos trans en alimentos consumidos habitualmente por los jóvenes en Argentina*. Argentina.

Ramírez, M., Sánchez, C., Pérez, A. & Millán, E. (2010). *Effect of a high saturated fatty acids load on serum concentrations of C-reactive protein, alpha1-antitrypsin, fibrinogen and alpha1-acid glycoprotein in obese women*. Departamento de Bioquímica, Escuela de Ciencias Biomédicas y Tecnológicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Valencia, Carabobo, Venezuela. Jan-Feb;25(1):72-9.

Sanjurjo, P., Trebolazabala, N., Aldámiz, L., Castaño, L., Prieto, J. & Andrade, F. (2008). *n-3 and n-6 fatty acids in plasma at birth and one year of age and relationship with feeding*. Departamento de Pediatría, Hospital de Cruces, Barakaldo, Vizcaya, España. Jun; 68(6):570-5.

Simopoulos A. (2009). *The Importance of the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio in Cardiovascular Disease and Other*



Chronic Diseases. The Center for Genetics, Nutrition and Health. 674-688, Washington, DC.

Simopoulos, A. (2001). *The Importance of the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio in Cardiovascular Disease and Other Chronic Diseases*. Washington, DC.

Tavella, M., Perego, L., Peterson, G., Espeche, M. & Marteau, S. *Ácidos Grasos Trans: Concepto e Implicancias Clínicas Programa de Prevención del Infarto en Argentina*.

Uauy, R., Aro, A., Clarke, R., Ghafoorunissa, R., Abbe, M., Mozaffarian, D., Skeaff, M., Stender, S. & Tavella, M. (2009). *WHO Scientific Update on trans fatty acids: summary and conclusions*.

Valenzuela, A. (2008). *Ácidos grasos con isomería trans. situación de consumo en latinoamerica y alternativas para su sustitución*. Rev Chil Nutr Vol. 35, Nº 3, 172-180. Septiembre 2008.

Valenzuela, A. (2008). *Ácidos grasos con isomería trans, su origen y los efectos en la salud humana*. Santiago de Chile, Chile.

Valenzuela, A. (2008). *Ácidos Grasos con isomería Trans, su origen y los efectos en la salud humana*. Centro de Lípidos, Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos, (INTA). Universidad de Chile, Santiago de Chile.

WHO (2003). *Report of a Joint Expert Consultation: Diet, Nutrition and the prevention of chronic diseases*. Technical Report Series 916. FAO/WHO, Ginebra.

Wijendran, V. & Hayes K. (2004). *Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health*. Annual Review of Nutrition. Vol. 24: 597-615. MA, USA.

Yépez, R. (2004). *Bioquímica Médica*. Quito: Arco Iris producción gráfica.

Zamorano, M., Llanquin, P. & Montenegro, R. (2010). *Fatty acid profile of high consumption foods by school population of the region Metropolitan of Chile, including trans fatty acid content*. Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad Tecnológica, Universidad de Santiago de Chile. Santiago de Chile, Chile. Sep; 60(3):306-11.



