

TESIS DE MAESTRIA

IMPLEMENTACIÓN DE HERRAMIENTAS DE GESTIÓN DE CALIDAD PARA
EL ESTUDIO DEL EFECTO DEL SOLVENTE EN LA OBTENCIÓN DE
TERPINEOL POR HIDRATACIÓN CATALÍTICA DEL LIMONENO.

AUTOR

Ing. Qca. Liliana Mariel Cáceres

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Ester R. Chamorro – Centro UTN QUIMOBÍ

CO-DIRECTOR DE TESIS

Bioqco. Esp. Gustavo A. Velasco - Centro UTN
QUIMOBÍ

LUGAR DE TRABAJO

Centro UTN de Investigación en Química Orgánica Biológica
(QUIMOBÍ) Facultad Regional Resistencia

Resistencia, mayo de 2014

A mis directores de tesis, Dra. Ester Chamorro y Bioqco. Gustavo Velasco, por la
paciencia, su orientación rigurosa y sus constantes aportes,

A mis compañeros de equipo del Centro de Investigación UTN, QUIMOBÍ, donde llevé
a cabo mi investigación, Ing. Silvia Zambón e Ing. Jessica Solís, por la motivación y el
trabajo compartido,

A la Subsecretaría de Políticas Universitarias de la Nación, por otorgarme una beca
PROFITE para la conclusión de mi maestría,

En especial, a mi mamá por estar siempre ahí, y a los amores de mi vida: mi esposo y
mi hermosa hija por el tiempo que les robé y su amor incondicional,

A todas las personas que colaboraron directa o indirectamente para la conclusión de
esta tesis,

Mi mayor agradecimiento.

CONTENIDO

1.INTRODUCCIÓN	1
1.1. ACEITES ESENCIALES	1
1.1.1. Definición.....	1
1.1.2. Origen y composición química.....	1
1.1.3. Usos e importancia.....	6
1.2. PRODUCCIÓN DE ACEITES Y ESENCIAS EN LA REGIÓN: ANTECEDENTES.....	7
1.3. Los aceites esenciales cítricos. Aceite esencial de pomelo.....	10
1.3.1. Composición del aceite de pomelo.	10
1.3.2. Propiedades.	12
1.3.3. Usos e importancia.....	13
1.4. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES.....	14
1.4.1. Destilación por arrastre con vapor de agua	14
1.4.2. Extracción por solventes.	14
1.4.3. Expresión:.....	15
1.4.4. Hidrodifusión.	18
1.4.5. Extracción utilizando ultrasonido.	18
1.4.6. Extracción por microondas.	19
1.4.7. Extracción con fluidos en estado supercrítico.....	19
1.4.8. Otros tratamientos.....	20
1.4.9. Rectificación.....	20
1.4.10. Fraccionamiento.	21
1.5. METODOS DE OBTENCIÓN DE PRODUCTOS DERIVADOS DE LOS ACEITES ESENCIALES. PRODUCTOS DE SEMISÍNTESIS.....	21
1.5.1. Esterificación:.....	21
1.5.2. Hidrogenación.....	22
1.5.3. Hidratación.....	22
1.5.4. Oxidación:	23
1.5.5. Ciclización:.....	23
1.6. MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN Y DE ESTUDIO DE LOS ACEITES ESENCIALES.....	23
1.6.1. TERPINEOL: USOS E IMPORTANCIA.	25
1.7. REACCIÓN CATALÍTICA DE OBTENCIÓN DE TERPINEOL.	28
1.7.1. Condiciones de la reacción.	29
1.8. EFECTO DEL SOLVENTE EN LA REACCIÓN DE OBTENCIÓN DE TERPINEOL.....	29
1.9. DISEÑO DE EXPERIMENTOS. APLICACIONES.....	31
1.9.1. Diseño unifactorial.....	32
2. OBJETIVOS	35

2.1.	OBJETIVO PRINCIPAL.....	35
2.2.	OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	35
2.3.	TIPO DE INVESTIGACIÓN A REALIZAR.....	35
3.	MATERIALES Y METODOS.....	37
3.1.	MATERIA PRIMA.	37
3.1.1.	Fruto.	37
3.1.2.	Aceite esencial de pomelo (<i>Citrus paradisi Macfayden</i>).	37
3.1.3.	Caracterización del aceite esencial.	38
3.1.4.	Composición química del aceite esencial.	40
3.2.	IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACION DEL TERPINEOL Y LIMONENO.....	41
3.3.	PLANIFICACIÓN DEL DISEÑO EXPERIMENTAL.....	41
3.4.	REALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO.	44
3.5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	45
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
4.1.	CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE DE POMELO.....	49
4.2.	CURVAS DE CALIBRACIÓN DE LIMONENO Y TERPINEOL.	50
4.3.	ANALISIS ESTADISTICO.	51
4.4.	CONCLUSIONES.	56
5.	BIBLIOGRAFÍA.....	59
6.	ANEXOS.....	65

LISTA DE TABLAS

<i>Tabla 1. Clasificación de los terpenos</i>	3
<i>Tabla 2. Clasificación de monoterpenos</i>	4
<i>Tabla 3. Clasificación de sesquiterpenos</i>	5
<i>Tabla 4. Observaciones del diseño experimental</i>	43
<i>Tabla 5. Tabla de análisis de varianza</i>	47
<i>Tabla 6. Propiedades físicas del aceite de pomelo</i>	49
<i>Tabla 7. Composición química del aceite de pomelo</i>	50
<i>Tabla 8. Tabla de intervalos de confianza individuales para las medias</i>	54
<i>Tabla 9. Potencia de la prueba ANOVA</i>	56

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1. Unidades de isopreno</i>	2
<i>Figura 2. Molécula de limoneno</i>	11
<i>Figura 3. Partes de la fruta de pomelo</i>	16
<i>Figura 4. Obtención de acetato de linalilo a partir de linalool</i>	22
<i>Figura 5. Hidrogenación del citral</i>	22
<i>Figura 6. Hidratación del α-pineno para la obtención de α-terpineol</i>	23
<i>Figura 7. Productos de oxidación del limoneno</i>	24
<i>Figura 8. Ciclización de (+)citronelal a los isómeros del isopulegol</i>	24
<i>Figura 9. Isómeros del terpineol</i>	26
<i>Figura 10. Hidratación y acetoxilación del limoneno</i>	30
<i>Figura 11. Variables del proceso de obtención de terpineol</i>	43
<i>Figura 12. Curva de calibración del limoneno</i>	51
<i>Figura 13. Curva de calibración de terpineol</i>	51
<i>Figura 14. Gráfica de probabilidad normal de los residuos</i>	53
<i>Figura 15. Gráfica de cajas del rendimiento porcentual de cada nivel</i>	55
<i>Figura 16. Curva de potencia para cinco observaciones</i>	56

RESUMEN

Argentina es el octavo productor mundial de cítricos, y la región noreste una de las más importantes en el volumen de producción. El aceite esencial cítrico, es considerado como un subproducto de esta industria, de bajo costo y nivel de producción, pero con gran potencial de desarrollo. Más todavía si se le agrega valor al industrializarlo, puesto que obtiene aplicaciones en un mercado más especializado. Un ejemplo, es el terpineol, un alcohol que puede ser obtenido a partir del limoneno, monoterpeno presente en mayor proporción en los aceites esenciales de los cítricos, incluyendo el pomelo. El terpineol posee un olor agradable similar a la lila y es un componente utilizado en cosmética, perfumería y farmacia, así como en productos no cosméticos tales como limpiadores y detergentes. Su uso en todo el mundo supera las 1.000 toneladas por año.

En este trabajo se utilizaron herramientas de calidad como el diseño experimental para estudiar el efecto del solvente en el proceso de obtención del terpineol por hidratación catalítica del limoneno.

El aceite esencial de pomelo, materia prima del proceso, se extrajo por expresión en una planta de cítricos de la región, se identificaron sus componentes por GC/MS, y se verificaron sus propiedades físicas. Se obtuvo el terpineol empleando condiciones de reacción constantes, y utilizando distintos solventes. Se analizaron los datos a través de un análisis estadístico de la varianza para comprobar si el solvente tiene un efecto significativo el rendimiento de la reacción. Por último se determinó cuál es el mejor solvente para obtener un mayor rendimiento en la reacción.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ACEITES ESENCIALES

1.1.1. Definición.

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas. Químicamente están compuestos principalmente por hidrocarburos terpénicos que se acumulan en glándulas o estomas odoríferos ubicados cerca de la epidermis. Estos estomas se encuentran principalmente en las hojas (eucalipto, citronela, menta, lemon grass), pero pueden estar en diferentes partes de la planta, desde la raíz (cebolla), tallos (peteribí, incienso), frutos (limón, naranja, pomelo) o semillas (anís, coriandro, pimienta).

1.1.2. Origen y composición química.

Las esencias contienen una gama muy variada de compuestos químicos. Asociados a los hidrocarburos terpénicos, aparecen también ésteres, alcoholes, aldehídos, cetonas, acetales, fenoles, glicósidos, ceras, hidrocarburos lineales, ácidos grasos, alcaloides, cumarinas, esteroides, y una cada vez más heterogénea variedad de compuestos heterocíclicos, a medida que se avanza en el conocimiento de su composición (Bandoni, 2003).

Es una característica de las esencias la presencia de Terpenos, también llamados isoprenoides. Éstos deben su nombre a Otto Wallach que originariamente diferenció entre “terpene” y “campher” por sus fórmulas empíricas $C_{10}H_{16}$ y $C_{10}H_{16}O$ ó $C_{10}H_{18}O$ respectivamente. El nombre de “terpeno”, deriva de la palabra alemana “terpentin”, de la inglesa “terpentine” y la francesa “térebenthine” que en español significa “trementina”. Se cree que este nombre fue tomado al ser precisamente el aceite de trementina el primero del cual se tiene testimonio escrito (Günther, 1961).

En la Figura 1 se puede observar una molécula de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) con las unidades cabeza-cola, compuesto del que tradicionalmente se considera que derivan los terpenos (Berger, 2007).

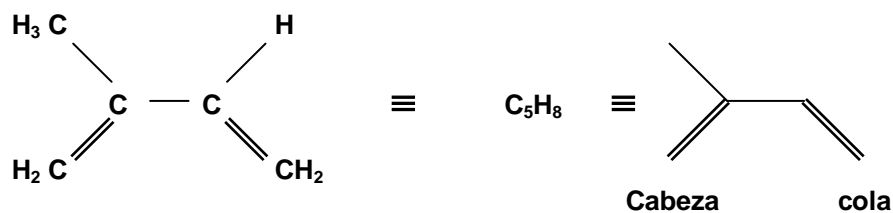


FIGURA 1. Unidades de isopreno

El químico alemán Otto Wallach, fue el primero en reconocer que muchos de los compuestos terpénicos podrían construirse hipotéticamente de esta manera. Este concepto, conocido como regla del isopreno, fue el primer paso en el conocimiento de la enorme variedad de terpenos. Esta estructura representa a la mayoría de los terpenos, pero hay excepciones, ya que también se producen combinaciones de cabeza a cabeza, como en las iononas y en el β -caroteno.

En 1950 la hipótesis de Wallach fue reiterada por Ruzicka, Premio Nobel en química 1939, quien propuso la “regla biogenética del isopreno” en la que estipula que los terpenoides son derivados de precursores alifáticos como el geraniol, para la formación de monoterpenos, el farnesol para los sesquiterpenos; geranil geraniol para los diterpenos y escualeno para los triterpenos. Confirmada luego la hipótesis del isopreno como unidad estructural de los terpenos, se tuvo en cuenta la cantidad de estas unidades en un compuesto determinado, para poder clasificar estas moléculas orgánicas. Se presenta en la Tabla 1 la clasificación aceptada de los Terpenos (Carson & Hammer, 2011).

Los terpenos más comunes en los aceites esenciales son aquellos de menor peso molecular, y por lo tanto más volátiles, es decir, monoterpenos y sesquiterpenos. Los monoterpenos se caracterizan por presentar diez átomos de carbono y por lo tanto dos unidades de isopreno. Muestran gran variabilidad de hidrocarburos, alcoholes, aldehídos y otros compuestos oxigenados que, en conjunto, engloban gran cantidad de isómeros no sólo funcionales sino también de posición y geométricos. Están considerados como una de las más grandes familias de productos naturales (Grayson, 2000). Se habla de monoterpenos regulares cuando se originan por la fusión “cabeza-cola” de dos unidades de isopreno, es decir, enlazando el carbono 1 de la primera unidad y el carbono 4 de la segunda, y se denominan irregulares cuando la fusión es del tipo “cabeza-

mitad”, enlazando el carbono 1 de la primera unidad de isopreno y el carbono 2 ó 3 del segundo. A partir de esta primera diferenciación se pueden subdividir atendiendo al número de ciclos que presentan: acíclicos, monocíclicos, bicíclicos y tricíclicos. Se presenta en la Tabla 2 algunos ejemplos de monoterpenos (Porter & Spurgeon, 1981).

Nombre	Unidades de isopreno	Átomos de carbono	Fórmula Molecular
Hemiterpenos	1	5	C ₅ H ₈
Monoterpenos	2	10	C ₁₀ H ₁₆
Sesquiterpenos	3	15	C ₁₅ H ₂₄
Diterpenos	4	20	C ₂₀ H ₃₂
Sesterpenos	5	25	C ₂₅ H ₄₀
Triterpenos	6	30	C ₃₀ H ₄₈
Tetraterpenos	8	40	C ₄₀ H ₆₄
Poli-isoprenoides	≥8	≥40	≥C ₄₀ H ₆₄

TABLA 1. Clasificación de los terpenos según el número de unidades de isopreno

Los sesquiterpenos se caracterizan por poseer 15 átomos de carbono y por lo tanto tres unidades de isopreno. Aunque por regla general la mayoría de ellos presentan una unión regular “cabeza-cola”, existen algunos que son el resultado de transposiciones en esta estructura. Aparecen ampliamente distribuidos en la naturaleza, además de los aceites esenciales, están presentes en mayor frecuencia que éstos en hongos, plantas no vasculares e incluso en algunas bacterias como *Streptomyces*. Este grupo presenta gran variabilidad natural, incluyendo a hidrocarburos, alcoholes, cetonas y sus derivados, ésteres, glicósidos y alcaloides sesquiterpénicos. Al contar con una unidad de isopreno más que los monoterpenos, presentan una mayor plasticidad en su construcción que se traduce en una mayor variabilidad estructural y funcional. Además, la presencia de isómeros geométricos de posición u ópticos es mucho mayor. Debido a esta plasticidad y según el número de anillos de la molécula, se pueden agrupar en acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos y tetracíclicos. En la Tabla 3 se muestran algunos ejemplos de monoterpenos.

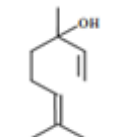
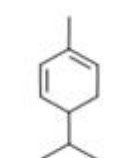
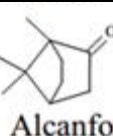
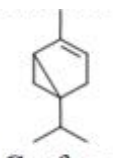
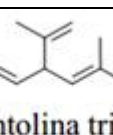
Monoterpenos Regulares	Alicíclicos	 Linalool
	Monocíclicos	 α-Felandreno
	Bicíclicos	 Alcanfor
Monoterpenos Irregulares	Monocíclico	 Canfeno
	Alicíclico (no cumple la regla del isopreno)	 Santolina trieno

TABLA 2. Clasificación de monoterpenos

La síntesis de terpenos en las plantas se produce en su mayoría a través de dos vías biológicas completamente distintas (Carson & Hammer, 2011). La primera constituye la biosíntesis del ácido mevalónico y ocurre principalmente en el citoplasma, en el retículo endoplasmático y en las mitocondrias de las células. Esta ruta biosintética parte de unidades de acetil coenzima A, que se condensan por medio de una reacción tipo Claisen para dar como producto el tioéster de la coenzima A (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA ó HMG-CoA). El cual se reduce a mevaldehído, y posteriormente a ácido mevalónico. Por acción de dos moléculas de Adenosin trifosfato (ATP) el mevalonato se fosforila y descarboxila para dar como productos los precursores de los terpenos, el pirofosfato de isopentenilo y su isómero, el pirofosfato de dimetilalilo. La ruta del mevalonato es prácticamente universal. Por esta ruta se sintetizan principalmente sesquiterpenos, triterpenos y politerpenos (Dewick, 2009).

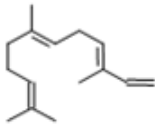
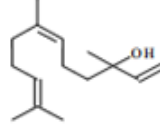
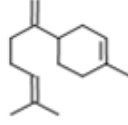
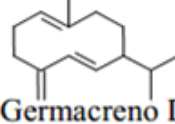
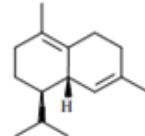
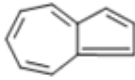

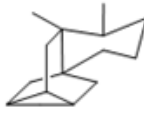
Sesquiterpenos	Alicíclicos	 α -Farneseno	 Nerolidol
	Monocíclicos	 β -Bisaboleno	 Germacreno D
	Bicíclicos	 δ -Cadineno	 Azuleno
	Tricíclicos	 Aromadendreno	
	Tetracíclicos	 Iswareno	

TABLA 3. Clasificación de sesquiterpenos

En 1988 Flesch observó que los patrones de marcación isotópica de terpenos presentes en la bacteria *Rhodopseudomonas* no coincidían con los correspondientes por una biosíntesis mevalónica (Flesch & Rohmer, 1988). Estudios posteriores encontraron que existía tanto en bacterias como en plantas una segunda alternativa independiente del mevalonato. En esta ruta de la biogénesis del pirofosfato de isopentenilo y γ,γ -dimetilalilpirofosfato, una unidad de ácido pirúvico se condensa con el D-gliceraldehído, para dar la 5-Fosfono-1-desoxi-D-xilulosa. Por medio de una condensación aldólica inversa, el carbono 1 transpone hacia la posición 2, generando así el 4-fosfono-2-C-metil-D-eritritol. Este intermediario se conjuga por medio de una sustitución nucleofílica con una unidad de citidilribósido, por acción del CTP, para formar 4-(CDP)-2-C-metil-D-

eritritol. Este compuesto se fosforila en el carbono 2, donde se forma el intermediario fosforilado y desplaza el citidilribósido para obtenerse el 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclofosfato. Por ruptura reductiva del ciclo se da una reacción de eliminación para formar el pirofosfato de 4-hidroxi-3-metil-but-2-enilo. El paso final consiste en la eliminación del grupo hidroxilo para obtenerse el catión alílico correspondiente, el cual puede transponerse de tal forma que se isomerizan de manera reversible el pirofosfato de isopentenilo y el γ,γ -dimetilalilpirofosfato. Esta ruta se lleva a cabo sobre todo en los plástidos de las plantas y en muchas células procariontes. Por esta ruta se sintetizan sobre todo monoterpenos, diterpenos y carotenoides. La condensación de geranilpirofosfato con una nueva unidad pirofosfato de isopentenilo da origen al farnesilpirofosfato, el cual es el precursor de todos los sesquiterpenos naturales.

Debido a esta complejidad en su composición, es aconsejable hacer una discriminación entre los compuestos contenidos en una esencia. Se habla entonces de compuestos mayoritarios, cuando están en la esencia en una proporción mayor al 1,0 o 0,5%, y los minoritarios, que en algunos casos pueden contarse por centenares, como en las esencias de jazmín, rosa, inmortelle o tuberosa. Esta clasificación de los constituyentes en función del contenido presente en cada esencia es fundamental tanto para determinar la calidad de la esencia, como así también para precisar sus características organolépticas o sus efectos fisiológicos. En muchos casos las notas olfativas características de las esencias están dadas por los componentes minoritarios y no por los principales. Lo mismo ocurre con los efectos sobre los seres vivos, por lo que los usos o aplicaciones pueden ser debido a la presencia de estos constituyentes. También es importante tener en cuenta que en algunas plantas los terpenos no están libres, sino que están unidos químicamente a azúcares, formando glicósidos o heterósidos (Bandoni, 2003).

1.1.3. Usos e importancia.

La utilización de sustancias aromáticas simplemente por razones de placer o medicinales es tan antigua como la humanidad. Se han utilizado aceites perfumados y ungüentos durante miles de años (Berger, 2007). Actualmente los aceites esenciales se han convertido en un elemento integral de la vida

cotidiana, formando parte de gran variedad de productos comerciales. Principalmente los aceites esenciales tienen dos grandes mercados. El primero está dado por sus características organolépticas, explotado primordialmente por la industria de sabores y fragancias. Y el segundo es el que se nutre de sus distintos componentes aislados o no (Bandoni, 2003). Dada la complejidad de su composición y la facilidad de su aislamiento o purificación, los aceites esenciales son una fuente ideal de materias primas para la industria. Se utilizan en una gran variedad de procesos como aromas y aditivos en productos alimentarios, como agentes aromatizantes en la industria de los cigarrillos, y en la composición de cosméticos y perfumes. Además, se utilizan en los ambientadores y desodorantes. Igualmente se usan en todas las ramas de la medicina como ser farmacia, termalismo, homeopatía y aromaterapia. En los últimos años, la importancia de los aceites esenciales como biocidas y repelentes de insectos ha dado lugar a un estudio más detallado de su potencial antimicrobiano. Por otra parte los aceites esenciales son también buenas fuentes naturales de sustancias con potencial comercial y como materiales de partida para la síntesis química de otros productos (Schmidt, 2010).

1.2. PRODUCCIÓN DE ACEITES Y ESENCIAS EN LA REGIÓN: ANTECEDENTES.

Argentina es el octavo productor mundial de cítricos y el primer productor mundial de limón. Exporta frutas frescas, jugos y aceites esenciales desde 1970. La superficie dedicada a citrus es de 147.000 hectáreas, con una producción total de alrededor de 3.000.000 toneladas anuales. La participación del sector citrícola genera un valor económico anual de 500 millones de dólares, de los cuales el 70% corresponde a exportaciones de frutas frescas, jugos concentrados y otros derivados. La principal producción corresponde a limón (47%), seguido por naranja (29%), mandarina (16%) y pomelo (8%). De la producción nacional de cítricos, las provincias del Noroeste Argentino generan el 64%, dentro de las cuales Tucumán lidera la producción de limón y Salta la de pomelos. Las provincias del Noreste son responsables del 36% de la misma y dentro de ellas Entre Ríos es la principal productora de naranja y mandarinas (UIA, 2006). Corrientes posee dos regiones citrícolas, el noroeste y el sudeste. La primera abarca los departamentos de Bella Vista, Saladas, Concepción,

Mburucuyá, General Paz, San Miguel, Ituzaingó, San Roque y Lavalle, los cuales poseen el 30,5% de la superficie de explotación. Mientras que la segunda región comprende el departamento de Monte Caseros que representa el 63,2% del área cultivada. La superficie estimada para la citricultura correntina es de unas 26.000 hectáreas lográndose una producción de 300.000 toneladas de las cuales el 58% corresponde a naranja y el 25% a mandarina. En la provincia de Chaco las plantaciones se encuentran principalmente en los departamentos Libertador General San Martín, Bermejo, General Donovan, 9 de Julio, Presidencia de la Plaza, Quitilipi, 25 de Mayo y Comandante Fontana. En esta zona se destina 2.000 hectáreas al cultivo de cítricos, de las cuales 1.350 hectáreas producen alrededor de 30.250 toneladas de pomelo, siendo esta fruta la de mejor adaptación y de excelente calidad (SENASA, 2012).

Argentina produce alrededor de 200.000 toneladas de pomelo, el 10% aproximadamente, se exporta como pomelo fresco, un 15-20% se industrializa y un 65-70% se consume internamente. Las exportaciones se dirigen principalmente a los países de la Comunidad Económica Europea, en menor medida a Europa del Este y actualmente a Chile, Bolivia y Canadá.

En cuanto a las exportaciones argentinas de aceites esenciales cítricos, éstas son poco significativas dentro de la totalidad de exportaciones (0,27% de participación en el año 2002), pero pueden considerarse como un producto con gran potencial de desarrollo. Generalmente tienen un valor alto en relación al volumen que representan, con una demanda internacional moderada y un mercado bien especializado como la industria alimenticia, farmacéutica o de perfumería. Cabe destacar que Argentina es el principal productor mundial de aceite esencial de limón, seguido por Estados Unidos e Italia, siendo la calidad de su producto superior a la de sus competidores y teniendo un volumen mundial comercializado que promedia las catorce mil toneladas (Exportar, 2002). Notablemente durante el período 1999-2008, la producción de aceites esenciales creció un 50%, superando el crecimiento registrado en el volumen industrializado de la materia prima, que sólo creció un 25%. Este incremento se logró por un mayor rendimiento industrial, debido a la adopción de nuevas tecnologías tales como el sistema Brown de prensado en frío (Bruzzone, 2008).

Con respecto al pomelo, de su producción total en el año 2005, el 74% se destinó a la industria de jugo concentrado y al aceite esencial. Esto es debido a

que uno de los problemas que aqueja al Noroeste Argentino en la producción de pomelo es la imposibilidad de acceder a mercados internacionales por las barreras fitosanitarias que limitan la exportación de fruta fresca. Por lo tanto para aumentar la rentabilidad del sector, algunos de los objetivos son, mejorar el mix entre fruta fresca y subproductos, reducir costos aumentando el valor agregado; mejorar las condiciones fitosanitarias e incrementar la investigación y desarrollo de nuevos productos industrializados (Union Industrial Argentina, 2007).

El Centro de Investigación en Química Orgánica Biológica, dependiente de la Facultad Regional Resistencia (QUIMOB), tiene fundados antecedentes de investigación en el área de los aceites esenciales, respondiendo siempre a necesidades concretas del ámbito socio-productivo de la región. En el año 2001, con el PID 25L011 “Identificación y caracterización de aceites esenciales de la flora chaqueña para el control de la *Varroa jacobsoni*”, se trabajó sobre la posibilidad de controlar al ácaro *Varroa destructor*, usando aceites esenciales, con una efectividad comparable a la de los acaricidas tradicionales. Se estudiaron varias especies aromáticas y se demostró el efecto varroicida del aceite esencial de *Tagetes minuta*, especie vegetal aromática ampliamente difundida en la Provincia del Chaco (Ballerini, et al., 2004) (Ballerini, et al., 2005).

En el año 2004, en el PID ALCORE 236H “Aceite de *Tagetes minuta*: Identificación de componentes varroicidas” fueron separados los componentes activos del aceite, frente al ácaro *Varroa destructor*. Su poder acaricida fue evaluado en forma individual, mediante bioensayos de laboratorio, sobre el ácaro (Chamorro, et al., 2008).

Desde los años 2008-2012, se realizó el proyecto PID 25L034: “Semisíntesis catalítica de isopulegol y otros productos de interés industrial, a partir de aceites esenciales regionales”. El proyecto consistió en el desarrollo de productos de síntesis de química fina, o semisíntesis, a partir de compuestos obtenidos de la rectificación de aceites esenciales naturales regionales. El trabajo se centró en la extracción de aceite esencial de citronela y de eucalipto citriodora, y su posterior enriquecimiento en citronelal. A partir del mismo se realizó la síntesis de isopulegol por ciclización estereoselectiva catalizada con catalizadores heterogéneos. La metodología se desarrolló además para otros productos de síntesis como ser los ésteres derivados del limoneno o alfa-pineno provenientes de aceites de citrus o pinos.

Actualmente, se encuentra en ejecución el PID 25L054: “Semisíntesis de terpineol con catálisis heterogénea a partir de aceites regionales y estudio de sus propiedades”. El proyecto es continuación del PID anterior, y consiste en el desarrollo de productos de síntesis de química fina a partir de compuestos obtenidos del aceite esencial de pomelo, los cuales se extraerán por expresión y serán caracterizados con distintos análisis (propiedades físicas, Cromatografía gaseosa (GC), espectroscopía de masas). Se buscarán luego las mejores condiciones para obtener, en este caso, terpineol por ciclización estereoselectiva catalizada con catalizadores heterogéneos. Luego serán estudiadas las propiedades antimicrobianas del mismo mediante pruebas de laboratorio.

El Centro QUIMOB I realiza asistencia técnica y transferencias a industrias y/o empresas del medio, efectuando análisis de control de calidad a materias primas y productos, como así también, desarrollando mejoras en procesos productivos. En el año 2008 se realizó la puesta a punto de una columna de extracción de aceites esenciales para citronela y eucalipto citriodora en la Empresa “Nuestra Esencia” de la provincia de Corrientes. También se realizó la optimización del proceso de extracción de aceites esencial de pomelo en una planta de extracción de zumos de cítricos de la Ciudad de Bella Vista, Provincia de Corrientes; se analizó cada etapa del proceso de obtención de aceite esencial como subproducto, efectuando una Auditoría de Calidad en el proceso y proponiendo una mejora en el rendimiento del aceite esencial.

1.3. Los aceites esenciales cítricos. Aceite esencial de pomelo

Existen algunos aceites esenciales que son producidos en forma excluyente por industrias específicas, no como producto principal, sino como subproducto de un proceso. El caso típico es la industria citrícola, donde los productos fundamentales son la fruta y el jugo de los cítricos, y como productos secundarios, industrializan entre otras sustancias como pectinas, flavonoides, vitaminas y aceites esenciales. (Bandoni, 2003).

1.3.1. Composición del aceite de pomelo.

Según la literatura, el aceite esencial de pomelo puede contener desde un 70 hasta un 96% de limoneno. Este terpeno de fórmula molecular $C_{10}H_{16}$, posee un

centro quiral, por lo tanto existen dos isómeros ópticos: R-limoneno y S-limoneno. En la Figura 2 se presenta la estructura molecular del limoneno.

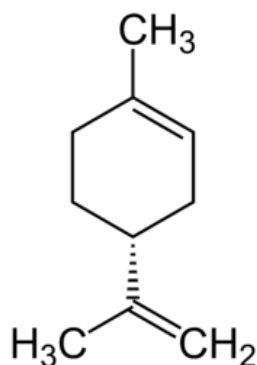


FIGURA 2. Molécula de limoneno

Entre los monoterpenos detectados en mayor proporción que le siguen al limoneno se encuentran: mirceno (1,29 -6,9%), α -pineno (1,60%), seguido de sabineno y trans- β -ocimeno. La fracción oxigenada del aceite obtenido por hidrodestilación es de 14,99%, siendo los alcoholes la porción mayoritaria de esta fracción. Uno de los alcoholes encontrados es el linalool (0,16 a 2,07%). Es importante destacar que compuestos como linalool, carvacrol y timol han sido reportados como principales constituyentes que exhiben propiedades antibacterianas en diferentes tipos de alimentos. Los aldehídos representan el 6,32% del aceite esencial de pomelo. El aldehído encontrado en mayor proporción es n-octanal (2,48%). Las cetonas y acetatos se encuentran hasta un 0,90% en el aceite y los sesquiterpenos encontrados representan el 4,92%, siendo el componente principal el (E)-cariofileno (0,17 a 1,64%), otros sesquiterpenos identificados pueden ser δ -cadineno, α -copaeno, germacreno D, β -cubebeno, α -humeleno, bicyclogermacreno, germacreno A, α -muuroleno y α -cubebeno (Soto, 2013).

Rojas encontró en el aceite de pomelo de la variedad Star Ruby, un 76,6% de limoneno, 6,15% de β -mirceno, 4,6% de trans-4,5-murola dieno, 2,66% β -pineno y 2,5% de trans- β -ocimeno (Rojas, et al., 2009)

Además existen informes que reportan un rango de 76 a 96% de limoneno en el aceite de cítricos (Espina, et al., 2011) (Kirbaslar, et al., 2006). Entre los monoterpenos detectados en mayor proporción que le siguen al limoneno

figuran: β -mirceno (1,29-6,90%) (Kirbaslar, et al., 2006). Los demás componentes se encontraron en una proporción menor al 1%.

En una investigación realizada por Soto, se informan 50 componentes identificados en el aceite esencial de pomelo, 8 monoterpenos y 11 sesquiterpenos que en conjunto representan la fracción hidrocarbonada y conforman un 81% del aceite esencial; 7 aldehídos, 19 alcoholes, 2 cetonas y otros compuestos oxigenados que constituyen la fracción oxigenada y en conjunto representan un 14,99% del mismo. El 95,98% de los componentes del aceite fueron identificados por comparación con el tiempo de retención de los patrones y con los espectros de masas registrados en las librerías de Nist (1997), McLafferty (1994) y Adams (2007), empleando los tiempos de retención derivados de los Índices de Kovats. La fracción monoterpénica es la más abundante, representando el 76,07%. La misma incluye un 70,04% de limoneno y un 4,00% de mirceno, 1,60% de α -pineno, seguido de sabineno y trans- β -ocimeno. La fracción oxigenada es de 14,99%, siendo los alcoholes la porción mayoritaria. El alcohol encontrado en mayor proporción es el linalool (2,07%). Los aldehídos representan el 6,32% del aceite esencial, de los cuales, un 2,48% es n-octanal. Además un 0,90% corresponde a cetonas y acetatos. Los sesquiterpenos representan minoritariamente un 4,92%, siendo el componente principal el (E)-cariofileno con un 1,64%. El resto de los sesquiterpenos identificados son δ -cadineno, α -copaeno, germacreno D, β -cubebeno, α -humeleno, bicyclogermacreno, germacreno A, α -muuroleno y α -cubebeno (Soto, et al., 2013).

1.3.2. Propiedades.

Soto encuentra para el aceite esencial de pomelo un valor de densidad relativa a 25 °C de 0,8539, el índice de refracción obtenido es de 1,4690, y una rotación óptica de +93°. Además, Pino refiere una densidad de 0,8433, un índice de refracción de 1,4692 y una rotación óptica de +94° (Pino, et al., 1999). Kesterton y Macduff determinan un rango de densidad relativa entre 0,8415 y 0,8539, un índice de refracción con un rango de 1,4714 a 1,4746, y una rotación óptica entre +91,50° y +96,50° (Kesterton & Mac Duff, 1971). Otro trabajo

realizado por Viuda se informa una densidad relativa de 0,8500 y un índice de refracción de 1,47 (Viuda, et al., 2008).

Por otra parte se observa una densidad relativa de 0,858, un índice de refracción de 1,4755 y la rotación óptica de $+93,40^\circ$ en bibliografía específica. (Günther, 1961). En las Normas del Instituto Argentino de Normalización IRAM SAIPA 18.586:1970, para el aceite de pomelo, se establece un rango de densidad relativa de 0,852-0,860, un índice de refracción de 1,474 a 1,479 y una rotación óptica entre 91° y 96° (IRAM SAIPA, 1970).

1.3.3. Usos e importancia.

La industria cítrica genera un gran volumen de desechos sólidos como la cáscara de los mismos. Este desecho proveniente de la obtención de jugos, normalmente se envía a vertederos a cielo abierto, por lo que genera un problema serio de contaminación. Esta situación hace deseable el aprovechamiento de los mismos para la elaboración de productos de mayor valor agregado, como la obtención de aceites. Además está ganando interés la utilización de éstos como materia prima de bajo costo, para la obtención de otros productos a través de biosíntesis. Esta opción de transformar desechos o materia prima de bajo costo en otras nuevas, se perfila como una alternativa atractiva para obtener compuestos que son económica o técnicamente inviables de conseguir por síntesis química tradicional.

Por otra parte los aceites esenciales cítricos producidos por destilación por arrastre con vapor de agua, suelen utilizarse en manufactura de pinturas, gomas y productos textiles. En cambio, si la destilación se hace con agua hirviendo, la principal consumidora es la industria de bebidas sin alcohol, que lo utiliza como saporífero. Además el principal uso al que se destinan es de proporcionar sabor, propio de estos aceites esenciales, a un producto terminado. El sabor puede ser simple o formar parte de una mezcla con otros componentes. (Cerutti, 2004) Asimismo, un aceite esencial cítrico puede rectificarse obteniéndose algún componente mayoritario, como por ejemplo el limoneno, utilizándose principalmente en la industria de sabores y fragancias, como disolvente, y en la fabricación de polímeros y adhesivos. Sus usos como disolvente han ido en

aumento a causa de la baja toxicidad, olor agradable y biodegradabilidad (Thomas & Bessiere, 1989)

1.4. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES

1.4.1. Destilación por arrastre con vapor de agua.

La destilación por arrastre con vapor de agua es sin duda el método más frecuentemente utilizado para la extracción de aceites esenciales a partir de plantas. En su forma más simple, se define como "la evaporación y posterior condensación de un líquido". Todos los líquidos se evaporan en mayor o menor grado, incluso a temperatura ambiente. Esto es debido a los movimientos moleculares inducidos térmicamente en algunas de las moléculas dentro del líquido hasta obtener la energía necesaria para ser expulsadas en el espacio aéreo por encima de él. La liberación de los aceites esenciales presentes en las glándulas odoríferas (células) de una planta se debe a la ruptura de las paredes celulares donde se aloja el aceite causado por el aumento de la presión inducida por el calor. El flujo de vapor actúa como portador de moléculas de aceite esencial. El método más simple de la extracción de aceite esencial es, por inmersión de la biomasa en agua hirviendo. El material de la planta absorbe el agua durante el proceso de ebullición y el aceite contenido en las células se difunde a través de las paredes celulares por medio de una ósmosis. Una vez que el aceite se ha difundido fuera de las células, se vaporiza y se deja llevar por la corriente de vapor. La volatilidad de los constituyentes de aceite no se ve influida por el grado de vaporización, pero depende del grado de solubilidad de los componentes en agua, como resultado de esto, los componentes esenciales más solubles en agua se destilan antes de los componentes más volátiles pero menos solubles.

1.4.2. Extracción por solventes.

La extracción con solventes sólidos también llamada enfleurage o enflorado se emplea para la obtención de esencias florales (rosa, jazmín, azahar, etc.). Consiste en colocar los pétalos de las flores sobre una superficie de grasa que se satura con el aceite, constituyendo la "pomada", de

donde luego se extrae el aceite con alcohol y se separa este por destilación. La extracción por solventes líquidos orgánicos se utiliza a escala de laboratorio, pues a nivel industrial resulta muy costosa por el alto valor comercial de los solventes y porque se obtienen esencias mezcladas con otras sustancias. Extrae no solo terpenos, sino también toda sustancia que sea soluble en el solvente utilizado. El material vegetal a procesar se pone en contacto con un solvente, en frío o en caliente y luego, eliminando el solvente por destilación a presión reducida, se obtiene el aceite esencial concentrado (Dellacassa, 2010).

1.4.3. Expresión:

Los aceites esenciales cítricos son producidos generalmente como subproductos en esta industria, donde los productos fundamentales son la fruta entera y el jugo. Hoy en día se utilizan principalmente métodos que permiten obtener tanto el zumo de la fruta y el aceite esencial en un mismo proceso (Günther, 1961). Los únicos sistemas de importancia para la producción industrial de estos aceites de cáscara de fruta, se pueden clasificar en cuatro categorías: máquinas "sfumatrici" y "speciale sfumatrici", máquinas "Pellatrici", proceso con la fruta entera o "FMC" y los "Extractores Brown de aceite (BOEs)" que utilizan la metodología de expresión o presión en frío para la extracción (Husnu & Buchbauer, 2010).

Antiguamente se practicaba mucho la expresión o presión en frío, sin la participación de calor externo, utilizando las herramientas que tenían disponibles, como piedras y elementos de madera, con los que rompían las células conteniendo aceite de la corteza de los cítricos. La razón de la utilización de métodos mecánicos para la extracción de aceites de cítricos de la cáscara de la fruta, es la inestabilidad térmica relativa de los aldehídos contenidos en ellos. Grasas, por ejemplo, y aldehídos alifáticos se oxidan fácilmente con el oxígeno atmosférico, lo que da lugar a la formación de ácidos carboxílicos de mal olor. Del mismo modo, aldehídos como neral, geranial, citronelal son sensibles a la oxidación. Además, algunos de los hidrocarburos terpénicos y los ésteres contenidos en los aceites de cáscara son también sensibles al calor y al oxígeno.

En la cáscara de la fruta, las células de aceite se encuentran justo debajo de la superficie, en el epicarpio, también llamado flavedo, en el área de color de la

fruta, como lo muestra la Figura 3. Las paredes de las células de estas glándulas sebáceas son muy duras y se cree que el aceite que contienen es o bien un producto de desecho del metabolismo, o una sustancia protectora de la planta de insectos.

Las máquinas utilizadas en el método "sfumatrici" consisten, en principio, de dos partes, una parte fija y una parte móvil. La fruta se corta en dos y se retira la pulpa. Luego, con el fin de extraer el aceite, la cáscara se aprieta suavemente, moviéndola entre las dos partes del dispositivo, y se enjuaga el aceite exprimido con un chorro de agua. El aceite se separa fácilmente del líquido en reposo y se recoge por decantación.

En el método "sfumatrici especial", la cáscara se remoja en una solución de cal durante 24 horas para neutralizar los ácidos contenidos en el epicarpio, antes de entrar a la máquina. Los aceites obtenidos por estos métodos deben ser refrigerados para congelar las ceras de la cáscara que luego se separan por filtración.

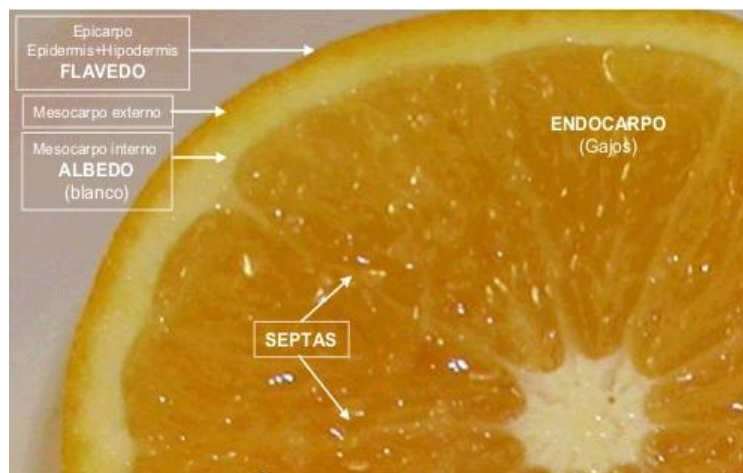


FIGURA 3. Partes de la fruta de pomelo

En el método "Pellatrici" se retira el aceite de la cáscara durante la primera etapa y el jugo del fruto en un segundo paso. En la primera etapa, se alimenta la fruta a través de una válvula de tipo tornillo de Arquímedes girando lentamente. El tornillo está cubierto con numerosos picos que perfora las células aceitosas en el epicarpio e inicia el flujo de aceite, que es eliminado por medio de un chorro de agua. El fruto por último se lleva a una rápida rotación, con un revestimiento de rodillos, donde las células de aceite restantes, que se encuentran más

profundas dentro del epicarpio, se comprimen y su contenido de aceite se recupera, lo que resulta en un máximo rendimiento de aceite. El proceso implica centrifugación, filtración, y refrigeración como se mencionó anteriormente.

El "proceso de Brown" se utiliza principalmente en los Estados Unidos y en América del Sur, pero menos en Europa. El BOE es algo similar a la maquinaria del método "Pellatrici". Un dispositivo en el extremo frontal controla la cantidad de fruta al entrar en la máquina. La máquina en sí se compone de numerosos pares de rodillos de púas que giran en la misma dirección, y se desplazan horizontalmente, llegando así a todas las células aceitosas. Las partículas sólidas se eliminan a continuación, haciéndola pasar a través de un tamiz fino. La emulsión luego se centrifuga y la fase acuosa se recicla. El sistema BOE se fabrica en acero para evitar el contacto de los productos con el hierro.

El tipo de extractor de uso más frecuente es el de la Corporación de Maquinaria para Alimentos en Línea, FMC-in-Line, por sus siglas en Inglés. En los Estados Unidos más del 50% de extractores son del tipo de FMC. Otros grandes países productores, como Brasil y Argentina utilizan exclusivamente extractores FMC. La razón de esto es el diseño de la maquinaria, donde el zumo de fruta y el aceite se producen en un solo paso sin que los dos entren en contacto uno con el otro. El proceso requiere la clasificación previa de la fruta, con unos vasos diseñados para diferentes tamaños de fruta. Un tamaño óptimo de la fruta es importante para el proceso ya que si la fruta es más grande, un poco de aceite esencial sería transportado en el jugo y le daría un sabor amargo. Por otro lado, si la fruta es demasiado pequeña se reduciría el rendimiento de zumo. Diferentes tamaños de marco permiten el tratamiento de 3,5 u 8 frutos al mismo tiempo. Esta técnica fue revolucionaria en su concepto y funciona de la siguiente manera: la fruta se transporta y se coloca en una copa fija. Otra copa, que lleva una relación de imagen especular de la copa fija, se coloca exactamente por encima de ella, encerrando así la fruta. Ambas copas contienen mandíbulas engranadas. Al mismo tiempo, una cuchilla circular corta un agujero en la parte inferior de la fruta. Cuando se aplica presión a la fruta, el jugo exprimido sale a través del orificio de corte y es transportado al colector de zumo, mientras que al mismo tiempo el aceite es expulsado de la superficie de la cáscara. Como en los otros métodos, se recoge el aceite usando un chorro de agua. La emulsión de aceite y agua se separa entonces mediante centrifugación.

Uno de los avances en el diseño de maquinaria de procesamiento de cítricos muestra claramente que la calidad del zumo es más importante que la calidad del aceite. Sin embargo, la calidad del aceite ha mejorado durante las últimas décadas y cumple con los requisitos de Normas Internacionales. La pulpa obtenida por expresión generalmente se trata con vapor de agua a alta presión para recuperar cantidades adicionales de aceite que haya transportado (Husnu & Buchbauer, 2010).

1.4.4.Hidrodifusión.

La Sociedad Montenier Technologies ha desarrollado un sistema de extracción de Hidrodifusión (HDF) que usa un flujo descendente de vapor de agua que pasa a través de la materia vegetal. La concepción de este extractor hace uso de la acción osmótica del vapor de agua, produciendo la liberación, bajo forma de azeótropo, del aceite esencial contenido en la materia vegetal. Este proceso de ósmosis conocido como hidrodifusión se basa en liberar y condensar el vapor aprovechando la gravedad, dispersando el azeótropo producido por el vapor de agua en la masa vegetal. Esta nueva técnica permite disminuir los inconvenientes de la hidrodestilación clásica. Los aparatos de este tipo funcionan actualmente en diferentes países. Este proceso se aplica en forma particular para el cardamomo y el romero (Bandoni, 2003).

1.4.5.Extracción utilizando ultrasonido.

La aplicación del ultrasonido ha sido utilizada en diversas ramas de la industria. En la extracción de aceites esenciales la aplicación del ultrasonido facilita la liberación del aceite esencial de la paredes celulares de la materia vegetal sometida al proceso extractivo. Se caracteriza por transmitir cantidades sustanciales de energía por la acción de vibraciones de las partículas presentes en el medio de extracción. El ultrasonido se localiza en el rango de frecuencias de aproximadamente sobre 18 kHz (por encima de las audibles por el oído humano). Con fines de conocer la influencia de los ultrasonidos en los procesos extractivos de materiales vegetales, la compañía DCF Aroma Process de Francia ha desarrollado un equipo Turbo destilador a nivel piloto que permite efectuar un

proceso de hidrodestilación acelerada discontinua, el cual cuenta con un generador de ultrasonidos de 22 kHz (Bandoni, 2003).

1.4.6.Extracción por microondas.

Es una técnica patentada originalmente en Canadá. Consiste en aprovechar el mismo proceso de los hornos a microondas caseros, es decir en calentar el agua contenida en el material vegetal, que a su vez está inmerso en un disolvente “transparente” a las microondas, como pueden ser CCl_4 , hexano o tolueno. Al aumentar la temperatura del medio, se rompen las estructuras celulares que contienen a la esencia por efecto de su presión de vapor. La esencia es así liberada y disuelta en el disolvente presente en el medio. La principal ventaja de esta técnica es su velocidad, pues pueden lograrse extracciones en minutos, cuando comparativamente una técnica tradicional como la hidrodifusión necesita varias horas. La implementación del sistema de microondas a escala industrial, si bien es factible tecnológicamente, implica una fuerte inversión económica. Además, como en cualquier cambio de las tecnologías tradicionales, los productos obtenidos suelen diferir en calidad de los normalmente ofrecidos en el mercado internacional, y pueden por lo tanto significar un problema para competir con el producto comercialmente consagrado.

1.4.7.Extracción con fluidos en estado supercrítico.

El principio básico para la extracción con fluidos en estado supercrítico se basa en el cambio de propiedades de transporte y de solubilidad que presenta un solvente en este estado. Para el caso del dióxido de carbono como fluido en estado supercrítico dos factores compiten en la influencia de la solubilidad de los solutos. Al incrementar la temperatura se incrementa la presión de vapor del soluto y por lo tanto su solubilidad. Mientras que la solubilidad de un compuesto en un disolvente líquido clásico depende de la temperatura, la solubilidad de un compuesto disuelto en un fluido supercrítico depende a la vez de la temperatura y de la presión, con la solubilidad y la presión variando en el mismo sentido. La presión es, entonces, un factor de selectividad de la extracción, de igual manera que la temperatura y la posibilidad de hacer variar la densidad en continuo de un

fluido supercrítico de 300 a 900 kg/m³ permite junto con la extracción fraccionada la separación fraccionada de solutos y disolventes (en el caso de dos o más disolventes). Si bien las aplicaciones industriales de la extracción con fluidos en estado supercrítico son limitadas, sus aplicaciones potenciales son numerosas y son actualmente el objeto de trabajos de investigación. Entre las aplicaciones positivas para las cuales el extracto constituye la fase noble, citemos la preparación de extractos de lúpulo, de sustancias aromáticas extraídas de especias, de café, de ciertas frutas, la separación de sustancias aromáticas a partir de biomasa. Las aplicaciones negativas tendientes a eliminar las sustancias indeseables como la cafeína del café o del té han suscitado un interés creciente ligado a la moda de alimentos ligeros obtenidos mediante el empobrecimiento calórico por eliminación de grasas, eliminación del colesterol de la mantequilla y de productos del huevo, desalcoholización de cerveza y vino, etc. A nivel industrial, el material vegetal, se empaca en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de él un fluido en estado supercrítico. Las esencias se solubilizan y arrastran mientras que el fluido supercrítico, se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente (Rodríguez Álvarez, et al., 2012)

1.4.8. Otros tratamientos.

Las esencias que se ofrecen en el mercado, pueden ser sometidas a una serie de procesos industriales con el objeto de mejorar sus características organolépticas, concentrar sus componentes útiles, facilitar su procesamiento industrial, o simplemente homogeneizar su calidad (Bandoni, 2003).

1.4.9. Rectificación.

Algunos aceites esenciales requieren rectificación luego de ser extraídos. Esto implica la redestilación del aceite crudo con el fin de eliminar ciertas impurezas no deseables, tales como cantidades muy pequeñas de componentes de muy baja volatilidad, que pueden ser transferidos durante el vapor o el agua de destilación (tales como fenoles de alto peso molecular, componentes de la cera de la hoja, etc.), así como pequeñas cantidades de compuestos muy volátiles, como sulfuro de dimetilo, aldehído isovalérico y ciertos compuestos

nitrogenados, por ejemplo. En algunos casos, la rectificación también se puede usar para enriquecer el aceite esencial en un componente particular, en el aceite de bajo grado. Normalmente este proceso se lleva a cabo por la redestilación en vacío para evitar el sobrecalentamiento y por lo tanto la descomposición parcial de los componentes del aceite. También puede llevarse a cabo por tratamiento al vapor (Husnu & Buchbauer, 2010)

1.4.10. Fraccionamiento.

Es similar a la rectificación, pero en este caso se hace una partición más específica, en función de la composición de la esencia. Por ejemplo los aceites esenciales ricos en citral son fraccionados por columna de rectificación, tratando de eliminar todos los componentes que acompañan al citral. Se puede así partir de una esencia que contenga 65 a 70% de citral, y lograr un citral de 90 o 97% de pureza. Otro ejemplo es fraccionar el aceite de citronela y obtener una fracción rica en citronelal (90%) y otras fracciones como geraniol y citronelol.

1.5. METODOS DE OBTENCIÓN DE PRODUCTOS DERIVADOS DE LOS ACEITES ESENCIALES. PRODUCTOS DE SEMISÍNTESIS.

Existen muchas reacciones químicas elementales que permiten obtener nuevos productos aromáticos a partir de aceites esenciales. Los productos nuevos pueden tener mayor valor agregado, con notas olfativas más agradables, y sin necesidad de mucha tecnología o de costosos reactivos.

1.5.1. Esterificación:

Las esencias de cedro, vetiver y menta suelen utilizarse para producir los acetatos de los alcoholes presentes en las mismas. Para ello no se aíslan estos alcoholes, sino que se usa la esencia completa para la reacción. Como ejemplo se puede observar la Figura 4, donde se muestra la obtención de acetato de linalilo, principal constituyente del aceite de lavanda y de bergamota, a partir de linalool, en presencia de anhídrido acético (Ac_2O), trietilamina (Et_3N) y 4-N,N-dimetil aminopiridina (DMAP) como catalizador.

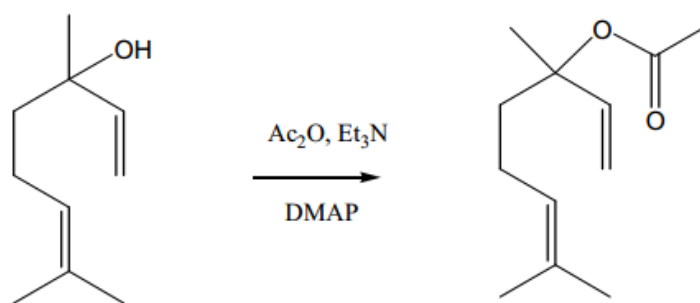


FIGURA 4. Obtención de acetato de linalilo a partir de linalool

1.5.2. Hidrogenación.

En este caso lo que se pretende es transformar cetonas o aldehídos a los alcoholes correspondientes. Un caso típico es la hidrogenación de la esencia de citronela, para obtener geraniol y citronelol y la hidratación del citral para obtener citronelal y geraniol entre otros, como se muestra en la Figura 5.

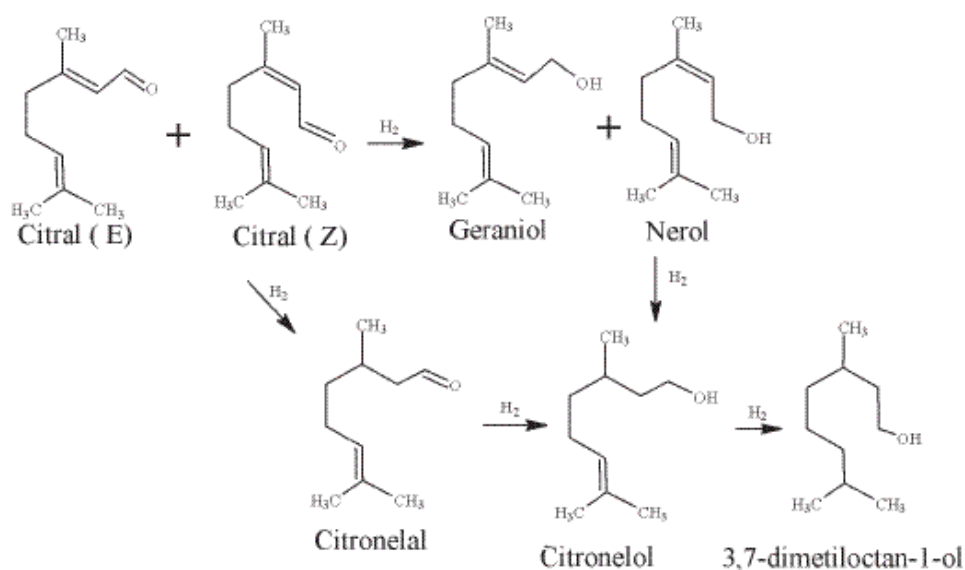


FIGURA 5. Hidrogenación del citral.

1.5.3. Hidratación.

Aunque es un proceso menos común dado que requiere la ayuda de catalizadores o medios específicos para la reacción, merece destacarse por la importancia que tiene la hidratación de los pinenos en la esencia de trementina.

Se utiliza, como una primera etapa, para la semisíntesis de innumerables sustancias aromáticas, como se muestra en la Figura 6.

1.5.4.Oxidación:

Es una reacción común entre los aceites esenciales. Se pueden emplear catalizadores sólidos o biológicos. Como ejemplo se puede citar al limoneno, que es un aceite esencial muy sensible al aire u oxígeno. En la Figura 7 se muestra la conversión de limoneno a alcohol perílico, carvona, carveol, y otros más de acuerdo al carbono que se oxida.

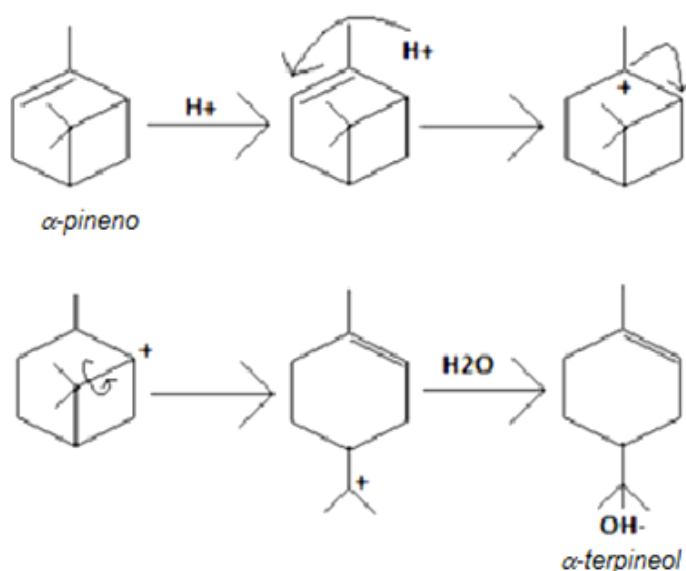


Figura 6. Ejemplo de hidratación del α -pineno para la obtención de α -terpineol

1.5.5.Ciclización:

Puede darse en los terpenos que contienen una función alcohol conjugada al doble enlace, o una función aldehído. Como ejemplo de esta reacción es la obtención de isopulegol a partir de citronelal, como se observa en la Figura 8.

1.6.MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN Y DE ESTUDIO DE LOS ACEITES ESENCIALES.

Para la identificación cuali y cuantitativa de un aceite esencial, se utiliza la técnica acoplada de Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (GC-MS). Esta técnica, gracias al desarrollo de columnas capilares de alta

resolución, permite analizar mezclas complejas presentes en éstos, e identificar sus componentes, a partir de los tiempos de retención, que son característicos para cada uno de ellos, y del espectro de masas de cada uno, con el cual se obtiene el peso molecular e información estructural. Asimismo existen bases de datos con los espectros de masas que sirven de criterio para la asignación química de muchos componentes de aceites esenciales.

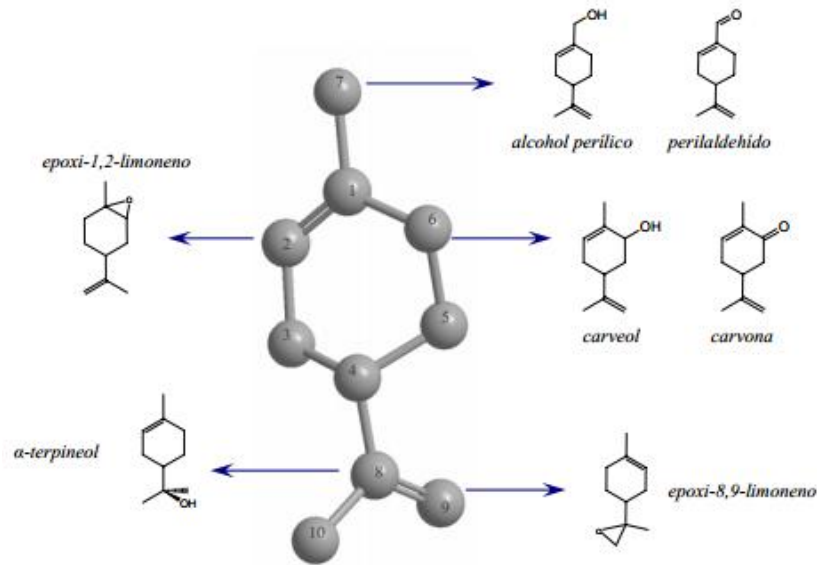


FIGURA 7. Productos de oxidación del limoneno.

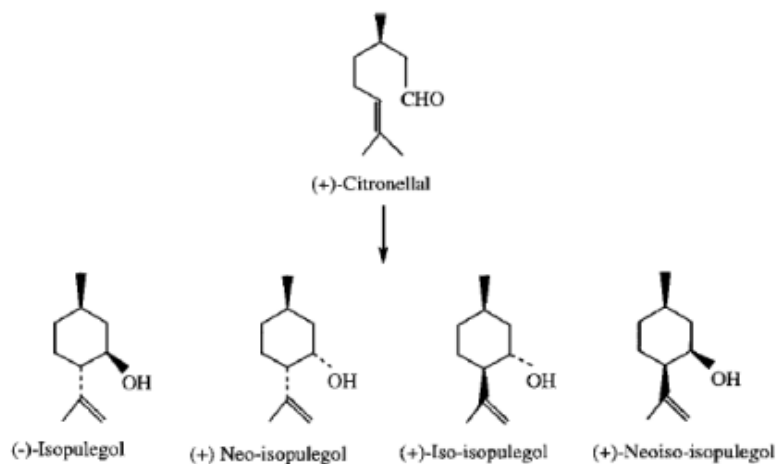


FIGURA 8. Ciclización de (+)citronelal a los isómeros del isopulegol

Los aceites esenciales deben cumplir una serie de características físicas, químicas y organolépticas, dependiendo del tipo de aceite. Estas características están fijadas para cada aceite. La referencia de comparación se encuentra en

las Normas elaboradas en conjunto por el Instituto Argentino de Normalización y la Sociedad Argentina para la Investigación de Productos Aromáticos (IRAM-SAIPA), como también la metodología para cada determinación. Algunas de las determinaciones son: la densidad relativa a 20°C (IRAM-SAIPA 18.504:2002), la determinación de rotación óptica (IRAM-SAIPA 18.507:2002), la determinación de índice de refracción (IRAM-SAIPA 18.505:2002) y la determinación de solubilidad en etanol (IRAM-SAIPA 18.510:1983). Entre las propiedades químicas que están normalizadas se encuentran las determinaciones: del índice de acidez (IRAM-SAIPA 18.511:1987), de alcoholes primarios y terciarios, de compuestos carbonílicos (IRAM-SAIPA 18.651:1988) y la determinación de fenoles; el uso de éstas va decayendo debido al avance de los métodos cromatográficos y espectroscópicos, que tienen la ventaja de ser más rápidos, completos y sensibles. Sin embargo en algunos casos por razones económicas o logísticas siguen siendo útiles y por ello se incluyen en todas las normas existentes.

1.6.1. TERPINEOL: USOS E IMPORTANCIA.

El terpineol es un alcohol monoterpeneo que se ha aislado de una variedad de fuentes tales como el aceite de pino, y en el aceite de petitgrain, existen cuatro isómeros: alfa (α), beta (β) y gamma (γ) –terpineol y el terpinen-4-ol. El β y el γ -terpineol difieren solo por la ubicación del doble enlace, como se observa en la Figura 9. Generalmente el terpineol es una mezcla de estos isómeros con el α -terpineol como el componente principal. Aunque es natural, comúnmente es manufacturado a partir del α -pineno que es más fácilmente disponible. El terpineol posee un olor agradable similar a la lila y es un componente utilizado en cosmética, perfumería, así como en productos no cosméticos tales como limpiadores y detergentes. Su uso en todo el mundo supera las 1.000 toneladas por año (Bhatia, et al., 2008).

Los aceites esenciales son considerados como metabolitos secundarios e importantes para la defensa de la planta, ya que a menudo poseen propiedades antimicrobianas (Fraenkel, 1959) (Tajkarimi, et al., 2010). Estas propiedades se evaluaron primeramente utilizando vapores de aceites esenciales en 1881 (Burt, 2004). Desde entonces, los aceites esenciales o sus componentes han

demostrado no sólo poseen un amplio rango de propiedades antibacterianas (Oussalah, et al., 2007), sino también antiparasitario (George, et al., 2009), insecticida (Essam, 2001), antiviral (Schnitzler, et al., 2011), antifúngicos (Silva, et al., 2011), y las propiedades antioxidantes (Brenes & Roura, 2010).

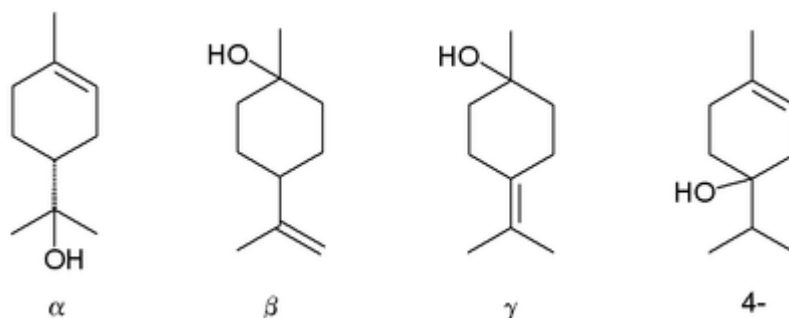


FIGURA 9. Isómeros del terpineol.

Gomes encontró actividad antimicrobiana en los aceites esenciales extraídos de las cáscaras de *Citrus aurantifolia*, *Citrus limon* y *Citrus sinensis*, los resultados fueron satisfactorios contra bacterias Gram-negativas (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella cholerasuis*) y hongos (*Aspergillus niger*, *A. flavus* y *A. carbonarius*) (Gomes, et al., 2014).

Por otra parte, en investigaciones de Baik, se analizó la composición química de catorce tipos de aceites de cítricos y se probaron sus actividades biológicas. Se encontraron limoneno (55,4% a 91,7%), mirceno (2,1% a 32,1%), α -pineno (0,6% a 1,6%) y linalool (0,4% a 6,9%) como principales componentes en la mayoría de especies de cítricos, donde nueve de los catorce aceites, exhibían actividad antibacteriana frente a *Propionibacterium acnés*, para una futura aplicación en cosméticos (Baik, et al., 2008).

Estudios realizados por Burt, han demostrado actividad antibacteriana de aceites esenciales contra *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteria*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*, también comprobó que organismos Gram-negativos son un poco menos susceptibles que las bacterias gram-positivas (Burt, 2004).

Gutierrez encontró actividad antimicrobiana de diferentes aceites esenciales en combinación, entre ellos los de albahaca, melisa, mejorana, orégano, romero, salvia y tomillo. Las pruebas positivas fueron inicialmente contra *B. cereus*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes* y *P. aeruginosa* (Gutierrez, et al., 2008).

Viuda-Martos estudió el efecto de los aceites esenciales de limón (*Citrus limón L.*), mandarina (*Citrus reticulata L.*), pomelo (*Citrus paradisi L.*) y naranja (*Citrus sinensis L.*) sobre el crecimiento de moldes comúnmente asociados con el deterioro de los alimentos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium chrysogenum* y *Penicillium verrucosum*. Todos los aceites mostraron actividad antifúngica. El aceite esencial de naranja fue el más eficaz contra *A. niger*, el aceite esencial de mandarina fue más efectivo para reducir el crecimiento de *Aspergillus flavus* mientras que el de pomelo fue el mejor inhibidor de *P. chrysogenum* y *P. verrucosum* (Viuda-Martos, et al., 2008).

Además, Król elaboró una revisión con las propiedades microbiológicas de algunos aceites esenciales como el eucalipto, orégano y albahaca y propuso un posible mecanismo de acción biológica. La actividad biológica y farmacológica de los aceites esenciales en el tratamiento y prevención de las enfermedades infecciosas (Król, et al., 2013)

Varios estudios han demostrado que los terpenoides son los principales responsables de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, siendo los más importantes en orden de actividad los que contienen grupos alcoholes (como el terpineol) luego los que poseen aldehídos y por último los que tienen grupos cetónicos. Por ejemplo, podemos mencionar que el aceite esencial de lemon grass posee cantidades considerables de (-)-citral, (+/-)-citral, citronelol, citronelal, linalool y geraniol los cuales han mostrado poseer actividad antimicrobiana ante *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* (Bathia, et al., 2008).

Por otra parte Maguna analizó la actividad antimicrobiana de un grupo de terpenoides (incluido el alfa-terpineol) sobre bacterias, encontrando que las bacterias Gram negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*), fueron más sensibles a los terpenoides (Maguna, et al., 2006).

Oyedemi además, estudió el mecanismo de actividad antimicrobiana de distintos componentes de aceites esenciales, entre ellos el α -terpineol, γ -terpineno y eugenol, para evaluar su efecto sobre la membrana bacteriana de cuatro cepas de bacterias: *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus*, *Proteus vulgaris* y *Escherichia coli*; encontrando que tanto la pared

celular y la membrana de las bacterias gram negativas y gram positivas tratadas, fueron dañadas de manera significativa (Oyedemi, et al., 2009)

Vila ha encontrado que el aceite esencia del árbol del té, obtenido de sus hojas y ramas tiernas de *Malaleuca alternifolia*, se caracteriza por su riqueza en terpinen-4-ol, y considera a este compuesto como el principal responsable, junto a otros como el α -terpineno, γ -terpineno y α -terpineol de las propiedades antibacterianas, antifúngicas, antiprotozoarias frente a tricomonas antiinflamatorias y antioxidantes del aceite esencial. Avala además el uso de este aceite por vía tópica en el tratamiento de la vulvovaginitis especialmente candidiásicas, y en diversas afecciones dérmicas con un componente infeccioso como acné, tinea pedis, forunculosis y onicomicosis. (Vila & Cañigual, 2006)

1.7. REACCIÓN CATALÍTICA DE OBTENCIÓN DE TERPINEOL.

El limoneno, α -pineno y β -pineno son monoterpenos de origen natural utilizados como sustratos para la producción de sabores y fragancias (Erman, 1985) (Chalk, 1988). Entre las rutas sintéticas más importantes se encuentran la hidratación catalizada por ácidos y la acetoxilación de terpenos de la que se obtienen valiosos alcoholes y ésteres, que tienen aplicaciones en perfumería y la industria farmacéutica (Erman, 1985). Generalmente se usa ácidos minerales como el ácido sulfúrico. Industrialmente, la hidratación de α -pineno para producir α -terpineol, que es uno de los 30 mejores compuestos de sabor comúnmente utilizados (Welsh, et al., 1989), se lleva a cabo principalmente utilizando soluciones acuosas diluidas de ácido sulfúrico y ácido fosfórico (Traynor & Albert, 1989). El α -Terpineol también se puede conseguir por hidratación (Matsubara, et al., 1987) o bioconversión (Tan, et al., 1998).

Se estudió también la velocidad de reacción de obtención de α -terpineol a partir de α -pineno, reacción similar a la del limoneno con catalizadores heterogéneos, tales como zeolitas dispersadas en membranas poliméricas (Vital, et al., 2001) y Román Aguirre sintetizó terpineol a partir de α -pineno por catálisis ácida homogénea (Román Aguirre, et al., 2005). Lemos Bicas además demostró que se pueden alcanzar altos rendimientos de obtención de R-(+)- α -terpineol a partir de R-(+)-limoneno (Lemos Bicas, et al., 2010). En otros estudios también se obtuvieron α -terpineol, p-mentano-1,8-diol y alcohol perílico como los

productos mayoritarios en la oxidación de limoneno, α -pineno y aceites esenciales de naranja y mandarina (con alto contenido de limoneno) en un proceso económico y limpio a microescala empleando el hongo *Aspergillus niger* DSM 821 como biocatalizador bajo condiciones normales de temperatura y presión (Castellanos Molina, 2007).

Yadav estudió la hidratación del limoneno en ácido acético acuoso, encontrando que en presencia de catalizador ácido, el limoneno produce un carbocatión y el nucleófilo ataca fácilmente en el doble enlace exocíclico (doble enlace carbono-carbono fuera del anillo pero que comparte un carbono con él, como se muestra en la Figura 10 (Ege, 1997), formando productos de adición como el α -terpineol (Yadav, et al., 2009)

1.7.1. Condiciones de la reacción.

En investigaciones realizadas por Ávila se estudió la reacción de hidratación de monoterpenos (α -pineno) catalizada por ácido tricloroacético soportado en zirconia (TCA). Utilizó 7,34 mmol de α -pineno, 10 ml de H₂O, 13,6 ml de alcohol isopropílico, una temperatura de 80 °C y diferentes tiempos de reacción, encontrando la mayor conversión de α -pineno (57%) a los 300 minutos de reacción (Ávila, et al., 2010).

Los estudios de hidratación catalítica heterogénea del limoneno de Yadav se realizaron con las siguientes condiciones: 2 ml de limoneno, 10 ml de ácido acético acuoso, temperatura de reacción de 50 °C y tiempo de reacción de 24 horas obteniendo un 65% de selectividad a terpineol y una conversión mayor a 60% (Yadav, et al., 2009).

1.8. EFECTO DEL SOLVENTE EN LA REACCIÓN DE OBTENCIÓN DE TERPINEOL.

Hace aproximadamente un siglo, se descubrió que el solvente puede cambiar dramáticamente la velocidad de las reacciones químicas. Desde entonces, la generalidad y la importancia del efecto del solvente sobre la reactividad química, en constantes de velocidad o constantes de equilibrio, ha sido ampliamente reconocida. Existen dos enfoques básicos para el tratamiento de los efectos del disolvente que se pueden distinguir: un enfoque

fenomenológico y un enfoque físico. El primero puede ser subdividido en el tipo dieléctrico y el tipo químico (Schmid, 2001).

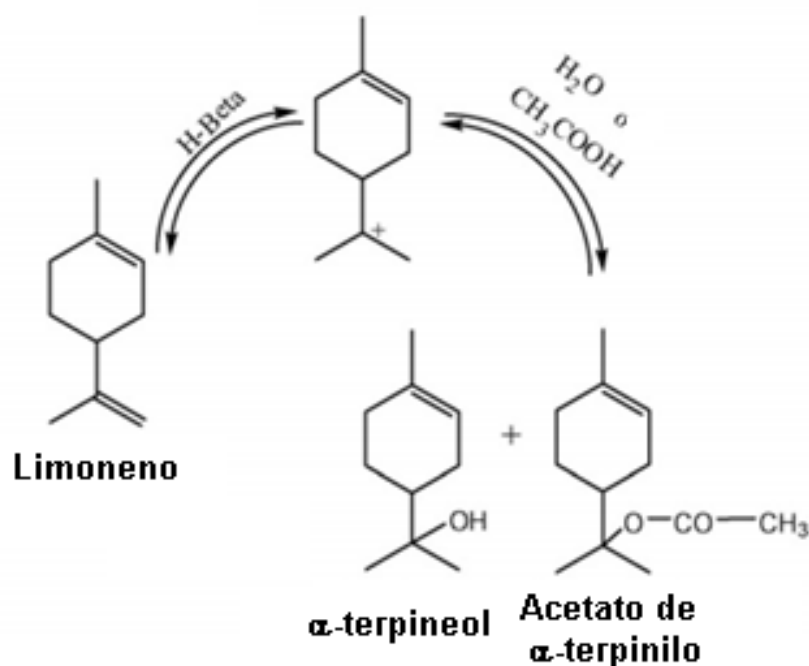


FIGURA 10. Hidratación y acetoxilación del limoneno

Eyler estudió el efecto del solvente sobre la descomposición térmica de trans-3,6-dimetil-3,6-difenil-1,2,4,5-tetraoxaciclohexano en solución, observando un importante efecto en la velocidad de reacción y en la energía de activación (Eyler, et al., 2004). Además Stolle investigó las condiciones de reacción de hidrogenación de benzalacetofenona y el efecto del solvente sobre la misma (Stolle, et al., 2011). Las propiedades físicas de una solución pueden ser reguladas por el solvente y dependen también de las características de éste (Flick, 1998). Además pueden encontrarse estados de transición dipolares con grandes efectos disolventes en distintos tipos de reacciones. Un solvente más polar incrementará o hará decrecer la velocidad de una reacción en función de que si el complejo activado en la reacción es más o menos polar que sus reactivos (Reichardt, 2004). Por otra parte Hidalgo Carrillo encontró un efecto solvente sobre la actividad y la selectividad para butanal, 1-butanol y alcohol crotilico, obtenido en la hidrogenación de crotonaldehído en fase líquida (Hidalgo-Carrillo, et al., 2010). También, Mukherjee estudió el efecto del solvente en la hidrogenación en fase líquida de citral en una reacción catalítica heterogénea, examinando y comparando la actividad específica y la selectividad

del producto en ocho disolventes no reactivos: n-amilo, acetato de etilo, n-hexano, ciclohexano, tetrahidrofurano, p-dioxano, etanol, ciclohexanol con propiedades físicas y electrónicas significativamente diferentes (Mukherjee & Vannice, 2006). Asimismo, Bertero investigó el efecto de solventes de diferente naturaleza: prótico, aprótico polar, y disolventes apolares, encontrando diferencias en la interacción catalizador-solvente (Bertero, et al., 2011). Del mismo modo, Meuldijk halló influencias de la composición del solvente sobre la actividad catalítica en la hidratación de 2-metil-propeno en soluciones de ácido p-toluensulfónico y poli ácido estirensulfónico (Meuldijk, et al., 1986).

1.9. DISEÑO DE EXPERIMENTOS. APLICACIONES.

Los experimentos son una parte natural de la ingeniería y de los procesos de toma de decisiones científicas. Las técnicas de diseño experimental basadas en la estadística son particularmente útiles cuando el objetivo buscado es la mejora de los procesos de manufactura, como así también en el desarrollo de nuevos procesos. Mediante el empleo de experimentos diseñados, los ingenieros pueden determinar el subconjunto de variables del proceso que tienen la mayor influencia sobre el rendimiento de éste. Los resultados de estos experimentos pueden conducir a: mejorar el rendimiento, reducir la variabilidad y acercarlo a los requerimientos nominales, disminuir el tiempo de diseño y desarrollo y disminuir el costo de operación. Los métodos de diseño experimental también son útiles para la evaluación y comparación de configuraciones de diseño básicas. Permiten la evaluación de materiales diferentes, la selección de parámetros de diseño de modo que el producto funcione bien bajo una gama amplia de condiciones de campo (diseño robusto) y la determinación de parámetros de diseño importantes del producto que tienen impacto sobre el funcionamiento de éste. El empleo del diseño experimental puede dar como resultado productos que son más fáciles de fabricar, productos que tienen un desempeño y una confiabilidad mejores que los de la competencia, y productos que pueden diseñarse, desarrollarse y producirse en menor tiempo (Montgomery & Runger, 2002)

1.9.1. Diseño unifactorial.

El diseño unifactorial es aquel donde se requiere conocer el efecto que tiene un solo factor sobre la variable respuesta. Un tratamiento de este diseño está dado por el nivel del factor, y las réplicas son las repeticiones sobre un nivel.

Al planificar un diseño de este tipo, se establece primeramente el objetivo y las hipótesis del mismo, luego se designa la variable respuesta y los niveles del factor. Se describe luego la unidad de análisis, y por último se realizan las pruebas y se obtienen los datos para su análisis estadístico.

Es de importancia fundamental identificar de forma muy específica el objetivo del experimento, es decir la pregunta exacta que se quiere contrastar. La misma sirve para luego establecer las hipótesis. Esta pregunta debe formularse por escrito y luego transformarla en hipótesis estadística a corroborar.

El siguiente paso es la identificación de las variables. Se determina la variable independiente o característica que se supone influye en la variable dependiente. Se establecen los niveles o categorías de este factor, para estudiar sus posibles efectos sobre la respuesta, por lo que se debe estar seguro de poder manipularla en el proceso. La variable dependiente o respuesta es aquella cuyos cambios se desean estudiar y mejorar en el proceso. Se determina además la metodología de su medición o control. Se pueden también establecer más de una respuesta a controlar si se supone que el factor influye en ellas.

En base a la naturaleza de la variable, las condiciones reales del proceso y la pregunta específica que se quiere contestar, se identifican los valores o el recorrido de valores de la variable independiente relevantes para el Experimento. Se establecen luego los tratamientos a efectuar. Es absolutamente aconsejable realizar varias observaciones para cada nivel de tratamiento o condición experimental, para que los errores de medida e influencias no controladas de variables extrañas puedan contrarrestarse entre sí. Se define luego la unidad de análisis del diseño especificando el sistema material donde se realizarán las observaciones. Esta unidad básica motivo del análisis se puede localizar dentro de un proceso industrial o una reacción química en un laboratorio, entre otros. Es necesario establecer claramente el sistema con las partes constituyentes del mismo, como ser: equipo que se usará, materiales necesarios y personal capacitado. También es importante explicitar el método de aleatorización para

asegurar que las diferencias que se encuentren entre los tratamientos son debidas a ellos mismos y no a efectos laterales no deseados. La aleatorización es una parte muy importante del diseño, ya que asegura que las diferencias que se encuentren entre los tratamientos son debidas a ellos mismos y no a efectos laterales no deseados.

Se debe también analizar la futura situación experimental e identificar los factores que puedan influir, además de la variable independiente, sobre los valores de la variable dependiente. Según su relevancia y las posibilidades técnicas, se toma la decisión necesaria respecto a los factores ruido y/o variables de bloqueo. Se puede tenerlos bajo control o constantes a lo largo de todas las observaciones, o integrarlos, como variable de bloqueo, o transformarlos en una variable independiente. O bien se espera que la aleatorización sea suficiente para que sus efectos se contrarresten en las repeticiones de cada tratamiento. Esta posibilidad es aceptable sólo si la variable en cuestión se encuentre fuera del control del investigador y se considera que su influencia es bastante limitada. Su efecto se engloba dentro del error experimental, o ruido.

Por último se crean las condiciones experimentales para efectuar las observaciones según el plan establecido, teniendo un cuidado particular en evitar posibles influencias extrañas sobre los valores de la variable dependiente. Se registran los resultados del Experimento, anotando además toda la información posiblemente relevante sobre las circunstancias prácticas de cada observación, como personal encargado de la medición, tiempos, condiciones de proceso, entre otras. Con los datos obtenidos se realiza el Análisis de Varianza (ANOVA), para extraer de los valores medidos la información buscada y necesaria para rechazar o no la hipótesis inicial. Este análisis consiste en establecer si los valores de la variable dependiente dependen efectivamente de los tratamientos, es decir de los valores de la variable independiente o supuesta causa, o si predomina el efecto de otros factores extraños como Error o Ruido.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO PRINCIPAL.

Implementar herramientas de calidad para evaluar, en la reacción de hidratación catalítica del limoneno para la obtención de terpineol, el efecto del solvente en el rendimiento y la calidad del producto.

2.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS.

- Planificar el diseño experimental con los solventes a probar.
- Evaluar el grado de conversión y la selectividad en la reacción de obtención de terpineol en los diferentes ensayos del diseño
- Analizar estadísticamente los datos obtenidos.
- Determinar de acuerdo a los resultados el solvente más adecuado para la reacción.

2.3. TIPO DE INVESTIGACIÓN A REALIZAR.

La presente investigación será un estudio exploratorio-descriptivo, con una metodología experimental donde se evaluará el efecto del solvente (variable de entrada) sobre el rendimiento de la reacción de hidratación catalítica de limoneno a terpineol en base a mediciones de conversión y selectividad (variables respuestas).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. MATERIA PRIMA.

3.1.1. Fruto.

La fruta que se utilizó fue *Citrus paradisi Macfadyen* varietal *Marsh Seedless* proveniente de la zona de Bella Vista de la provincia de Corrientes, Argentina, conocido comúnmente como pomelo. El fruto posee un diámetro de 90 a 95 mm, un espesor de cáscara de 7 a 9 mm, 4 semillas por fruto, siendo el color de pulpa blanco a blanco amarillento y obteniendo una madurez interna a principios de abril donde alcanza una relación de sólidos solubles/acidez de 5 y un porcentaje de jugo de 40%, llegando a junio con 6,5 y 45% respectivamente (Santinoni et al., 2012).

3.1.2. Aceite esencial de pomelo (*Citrus paradisi Macfayden*).

El aceite esencial fue obtenido como subproducto en el proceso de elaboración de jugo de pomelo. Fue extraído de la cáscara de la fruta, por el método de expresión. El equipo utilizado fue desarrollado por Food Machinery Corporation (FMC) "In line".

A través de una auditoria del procesamiento de fruta en la planta, se obtuvo información acerca de la extracción del aceite esencial en cada etapa.

La primera etapa fue la limpieza de la materia prima. La fruta llegó a la fábrica en camiones pesados en una báscula. Estos descargaron la fruta sobre una rampa y mediante cintas transportadoras y elevadores de cangilones, se la almacenó en ocho silos. Luego se condujo la fruta mediante cintas transportadoras al sector de lavado. El cual constaba de rodillos con cepillos y un distribuidor de agua, que la dosificaba en forma de rocío. La limpieza se realizó por fricción con los cepillos y entre ellas mismas.

La segunda etapa consistió en la extracción del aceite esencial. Al salir del sector de lavado, se llevó la fruta mediante un elevador de cangilones a la máquina de expresión del tipo FMC. En ella, la fruta se orientó mediante divisiones a la entrada de la máquina, constituida por dos copas de acero inoxidable dentadas que intercalan sus dientes cuando cierran a presión.

Inmediatamente, una lluvia continua de agua arrastró el aceite formándose la primera emulsión de agua, aceite, restos de corteza y sólidos en suspensión. El jugo y la pulpa se extrajeron por un tubo inferior, previa filtración, y la corteza fue expulsada por la copa inferior.

Seguidamente, la emulsión y las cáscaras pasaron a través de un sistema separador de partículas, denominado “finisher”; en el que se separaron los restos gruesos de cáscara de la emulsión y sólidos finos en suspensión. La emulsión filtrada pasó a una pileta decantadora de acero inoxidable provista de dos mallas con orificios de tamaños decrecientes. Con una bomba se envió la emulsión a los tanques de acero inoxidable, asegurando de esta forma un caudal continuo en la centrifuga. Se consiguió así la concentración a través de la separación de las fases, la acuosa o pesada, con un bajo contenido de aceite y la oleosa o liviana, con alto porcentaje del mismo. Posteriormente, con una centrifugadora pulidora de alta velocidad, conectada en serie a la primera centrifuga, se logró separar el aceite esencial del agua. En esta etapa se debió tener en cuenta que el contenido de aceite de la emulsión sea el indicado (50-70%) para el correcto funcionamiento de la maquina. Al aceite obtenido se lo recogió en baldes de acero inoxidable y se lo transfirió a tambores almacenados en una cámara a una temperatura de -18 °C, durante un mes como mínimo. Pasado ese periodo se realizó la extracción de la cera justo antes de entregar el aceite al comprador, aprovechando las propiedades antioxidantes de la cera, para la conservación del mismo. Luego se lo almacenó nuevamente en tambores dentro de una cámara refrigerada.

3.1.3. Caracterización del aceite esencial.

La caracterización del aceite de pomelo se llevó a cabo mediante la determinación del Índice de refracción, densidad relativa y rotación óptica utilizando técnicas normalizadas.

La densidad relativa se realizó acorde a la Norma IRAM-SAIPA 18504:2002, “Determinación de densidad relativa a 20 °C”, mediante el método picnométrico. Se utilizó a tal fin una balanza Mettler Modelo AJ150 con precisión de 0,1 mg. El procedimiento consistió en la determinación de la masa de agua (m_{H_2O}) contenida en el picnómetro, por diferencia de peso del picnómetro con y sin agua

destilada, y la masa del aceite (m_{aceite}) utilizando la misma técnica pero con el aceite esencial, y con el mismo picnómetro. Ambos a la temperatura de referencia, $20 \pm 0,2$ °C.

La densidad relativa del aceite se calculó aplicando la siguiente ecuación:

$$d_{20^{\circ}\text{C}/4^{\circ}\text{C}} = m_{\text{aceite}} / m_{\text{H}_2\text{O}}$$

donde:

$d_{20^{\circ}\text{C}/4^{\circ}\text{C}}$: densidad del aceite a 20 °C, relativa a la del agua a 4 °C.

m_{aceite} : masa de aceite en el picnómetro lleno a 20 °C (g).

$m_{\text{H}_2\text{O}}$: masa de agua calculada en la calibración del picnómetro (g).

El índice de refracción según la norma IRAM-SAIPA 18505:2002, “Determinación de índice de refracción” con un refractómetro de Abbe Modelo DR-M2, con control termostático de temperatura mediante camisa de circulación de agua entre los prismas. La precisión del instrumento es 0,0001 para un intervalo dinámico de $n_D^{20} = 1,300 - 1,700$. La medición se basa en la observación de la línea límite de la reflexión total como una franja que divide dos campos (claro y oscuro) sobre el punto de intersección del retículo. Se realizó la lectura en el refractómetro con la muestra de aceite (1 o 2 gotas), termostatizada a 20°C.

La determinación de la rotación óptica $[\alpha]_D^t$, se realizó bajo la Norma IRAM-SAIPA 18507:1987: “Determinación de rotación óptica”, utilizando un polarímetro del disco Tipo WXG-4, con rango de medición $\pm 180^\circ$ y precisión de $0,05^\circ$. El procedimiento se basó en la observación del ángulo de desviación de la luz polarizada plana, de longitud de onda 589 nm (línea D del Sodio), ocasionado por el aceite esencial colocado en un portamuestras de 10 dm de longitud a $20 \pm 0,2$ °C. Para ello, la muestra de aceite se estabilizó a la temperatura de $20 \pm 0,2$ °C en un baño de agua. La medición de la rotación angular se realiza cuando se enfoca el campo visual a igual claridad, punto intermedio entre dos campos (un círculo oscuro con una línea clara en el centro y otro círculo claro con la línea oscura en el centro).

La lectura se realizó en la escala externa ($\alpha_{\text{observado}}$) y la rotación óptica del aceite se calculó aplicando la siguiente expresión:

$$[\alpha]_D^t = \alpha_{\text{observado}} 100/l$$

donde,

$[\alpha]_D^t$: rotación óptica a 20 °C para la línea D del sodio (°).

$\alpha_{\text{observado}}$: ángulo de rotación óptica observada (°).

l: longitud del tubo portamuestras (mm).

3.1.4. Composición química del aceite esencial.

La composición relativa del aceite esencial de *Citrus paradisi* se obtuvo cromatografía gaseosa en un equipo SHIMADZU modelo GC 14B, con una columna Mega Bore DB-WAX P/N 125-7032 (30 m de longitud x 0,53 mm de diámetro interno x 1 µm) y detector de ionización de llama (FID). Se trabajó con 0,2 µl de muestra y la programación de temperatura fue de 30 °C por 5 minutos, luego un aumento de 10 °C por minuto hasta alcanzar la temperatura final de 200 °C, que se mantuvo durante 10 minutos, la temperatura del FID fue 220 °C y la del inyector 180 °C.

La identificación de los componentes del aceite esencial de *Citrus paradisi*, se realizó mediante la técnica acoplada cromatografía de gases espectrometría de masas (GC/MS). Se utilizó un equipo Shimadzu modelo QP 5050, con dos columnas capilares: una SE 52 (Mega, Legnano, Italia) unida químicamente (25 m x 0,25 mm de diámetro interno; 0,25 µm de espesor de fase fija), recubierta con 5% de fenil-polimetilsiloxano (0,25 µm de espesor de fase fija) temperatura en la columna: 60 °C (8 min), aumentando hasta 180 °C a una velocidad de 3 °C/min; luego hasta 230 °C a una velocidad de 20 °C/min. Temperatura del inyector 250 °C, modo de inyección split; relación de split 1:40; volumen de inyección: 0,2 µl de aceite. Fase móvil: helio, 122,2 kPa (51,6 cm/seg), temperatura de interfase: 250 °C; rango de adquisición de masa 40-400 m/z. La otra fue una columna capilar de sílice fundida BP-20 (SGE, Australia), de 25 m x 0,25 mm de diámetro interno, recubierta con polietilenglicol 20.000 (0,25 µm de espesor de fase fija). Temperatura en la columna 40 °C (8 min), aumentando hasta 180 °C (3 °C/min), y a 230 °C (20 °C/min). Temperatura del inyector 250 °C, modo de inyección split, relación de split 1:40; volumen inyectado: 0,2 µl de aceite. Fase móvil: helio, 92,6 kPa (55.9 cm seg-1), temperatura en interfase:

250 °C; rango de adquisición de masas: 40-400 m/z. Los patrones de fragmentación de cada componente se compararon con los almacenados en la biblioteca de espectros del software (Adams, 2001; Mc Lafferty, 1991).

3.2. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACION DEL TERPINEOL Y LIMONENO

La identificación del terpineol en el producto de reacción se realizó mediante una Cromatografía Gaseosa comparando el tiempo de retención con el del patrón α -terpineol de Fluka. La cromatografía se realizó en un cromatógrafo SHIMADZU GC 14B, utilizando una columna polar MegaBore DB-WAX P/N 125-7032 de 30 m de longitud x 0,53 mm de diámetro interno x 1 micrón de espesor, conectada a un detector FID. La temperatura del detector fue de 220 °C y la temperatura de inyector de 180 °C. La temperatura de la columna isotérmica en 30 °C por 2 minutos, luego comenzó una rampa de 5 °C/min hasta 200 °C y por último isotérmica a 200 °C por 10 minutos.

Para la cuantificación se empleó la técnica cromatográfica del estándar interno. El método consistió en construir una curva de calibración utilizando una serie de soluciones que contienen igual cantidad del estándar interno e incrementos en la cantidad del compuesto a cuantificar (limoneno y terpineol). Se inyectaron las soluciones y del cromatograma se obtuvieron las áreas del compuesto (A_c) y del estándar (A_e). Se calculó la relación entre las áreas A_c/A_e , y se la representó en un grafico en función de la concentración del compuesto de cada solución. Finalmente para conocer la concentración en una muestra desconocida se interpoló en la curva el valor de la relación de las áreas obtenida del cromatograma de la misma.

Para la cuantificación del limoneno en el aceite de partida, se empleó la misma técnica, utilizando el patrón limoneno de Fluka.

3.3. PLANIFICACIÓN DEL DISEÑO EXPERIMENTAL.

El objetivo del experimento fue determinar si el solvente tuvo algún efecto sobre el rendimiento de la reacción catalítica de hidratación del limoneno para la obtención de terpineol. Se planteó la pregunta: ¿El solvente afecta al rendimiento de la reacción?

Las hipótesis que se formularon fueron las siguientes:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k$$

H_1 : Al menos dos de las medias no son iguales

Donde μ es la media de la variable respuesta: rendimiento de la reacción, para cada tratamiento. Si la hipótesis nula es verdadera significa que los cambios en los niveles del factor solvente no tienen efecto sobre la variable respuesta.

Se determinó como unidad de análisis, la reacción de hidratación catalítica del limoneno a terpineol.

La variable independiente o factor a estudiar fue el solvente. Sus niveles son categóricos, seleccionados de acuerdo a su polaridad. Se eligieron cuatro solventes, uno polar aprótico (acetona), dos polares próticos (alcohol isopropílico y ácido acético) y uno apolar (tetracloruro de carbono). También se tomó como nivel la reacción sin solvente. El diseño entonces abarcó cinco tratamientos o niveles ($k=5$) y se realizaron cinco réplicas por nivel ($n=5$), es decir un total (N) de veinticinco observaciones ($N=kn=25$) (Tabla 4).

Se seleccionó como variable dependiente o respuesta el rendimiento de la reacción, expresado en porcentaje de limoneno convertido a terpineol.

Para reconocer otros factores que pueden influir en el sistema o unidad de análisis del experimento, se lo consideró a éste como un proceso, en el que existen variables de entrada y de salida (Figura 12). Se identificaron como variables controladas a la temperatura, y el tiempo de reacción, que se mantuvieron constantes en todos los ensayos. Se utilizó también el mismo lote de reactivos. Además se trabajó solo con dos operadores calificados.

Se empleó además un método manual para la aleatorización de las corridas. Un procedimiento muy fácil y común para asignar el orden y los operadores a los diferentes tratamientos al azar. Se escribieron todas las corridas en papeles, se colocaron en una bolsa y se mezclaron. Se hizo lo mismo con los operadores. Luego se extrajeron los papeles de los tratamientos de la bolsa, y un papel de los operadores, se fueron anotando en una planilla los tratamientos en el orden de salida y con el operador correspondiente.

Observaciones	Niveles del Factor Solvente
y ₁₁	Sin solvente
y ₁₂	Sin solvente
y ₁₃	Sin solvente
y ₁₄	Sin solvente
y ₁₅	Sin solvente
y ₂₁	Alcohol Isopropilico
y ₂₂	Alcohol Isopropilico
y ₂₃	Alcohol Isopropilico
y ₂₄	Alcohol Isopropilico
y ₂₅	Alcohol Isopropilico
y ₃₁	Acetona
y ₃₂	Acetona
y ₃₃	Acetona
y ₃₄	Acetona
y ₃₅	Acetona
y ₄₁	Acido Acético
y ₄₂	Acido Acético
y ₄₃	Acido Acético
y ₄₄	Acido Acético
y ₄₅	Acido Acético
y ₅₁	Tetracloruro de Carbono
y ₅₂	Tetracloruro de Carbono
y ₅₃	Tetracloruro de Carbono
y ₅₄	Tetracloruro de Carbono
y ₅₅	Tetracloruro de Carbono

TABLA 4. Observaciones del diseño experimental



FIGURA 11. Variables del proceso de obtención de terpineol a partir de limoneno

3.4. REALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO.

Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a procedimientos elaborados a tal fin (Anexo1: “Flujo Operativo de la Reacción de obtención de terpineol”)

Se armó el equipo de reacción, con un reactor de vidrio de aproximadamente 60 ml conectado con uniones esmeriladas a un refrigerante a reflujo y sobre una manta calefactora, con agitación magnética (Figura 15).



Figura 15. Equipo utilizado en los ensayos.

Se pesaron luego los reactivos dentro del reactor, empleado una relación másica entre el agua y aceite de 3:1. El catalizador TCA, y el solvente, se pesaron en relación 1:1:1 con el aceite esencial. Se utiliza una balanza Mettler Modelo AJ150 con precisión de 0,1 mg. El orden de pesada fue siempre el mismo, pesando primeramente los reactivos menos volátiles para evitar su evaporación. Se pesó primero el agua, luego el TCA, después el aceite de pomelo y por último el solvente.

Se colocó dentro del reactor el imán para agitar, y luego se lo conectó al refrigerante de reflujo. Se verificó que el reactor quede inmerso en el baño de silicona para que toda la mezcla reaccionante llegue a la temperatura de reacción. Se colocó el termómetro en el baño. Se encendió la manta calefactora, el agitador y la bomba de agua. La temperatura de reacción se mantuvo a 80 °C y se controló cada media hora. El tiempo total de reacción fue de 8 horas.

Luego de finalizada la reacción, se dejó enfriar el reactor y se separó la mezcla de reacción por centrifugación. La fase orgánica se guardó en envases de color caramelo para su resguardo de la luz y la acuosa en envase de vidrio transparente. Se conservaron ambas en freezer.

Se cuantificó la concentración inicial de limoneno y las concentraciones finales de limoneno y terpineol. Se realizó una cromatografía gaseosa a las muestras empleando el método del estándar interno.

Con las concentraciones de terpineol y limoneno obtenidas de las curvas de calibración se calculó el rendimiento de la reacción, con las ecuaciones siguientes:

$$R\% = \frac{Cv_{limoneno}}{Sv_{terpineol}} 100 ; \quad Cv_{limoneno} = \frac{C_i - C_f}{C_i} ; \quad Sv_{terpineol} = \frac{C_f_{terpineol}}{Cv_{limoneno}}$$

donde:

R% es el rendimiento porcentual de la reacción a terpineol, $Cv_{limoneno}$ es la conversión del limoneno, $Sv_{terpineol}$ es la selectividad a terpineol, C_i la concentración inicial de limoneno, C_f la concentración final de limoneno y $C_f_{terpineol}$ la concentración final de terpineol en la reacción.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El modelo estadístico de cada observación puede escribirse:

$$Y_{ij} = \mu_i + \varepsilon_{ij} \quad i = 1, 2, \dots, k, \quad j = 1, 2, \dots, n$$

donde μ_i es la media del i -ésimo tratamiento (constituido por la media global μ más un efecto que se debe al tratamiento o nivel), y el término ε_{ij} representa el error aleatorio y mide la desviación que tiene la observación j -ésima de la i -ésima muestra, con respecto de la media del tratamiento correspondiente.

En el análisis de varianza (ANOVA) se tiene la variabilidad total de los datos descrita por la suma total de cuadrados:

$$SS_T = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^n (y_{ij} - \bar{y})^2$$

donde \bar{y} es el promedio de las observaciones de los 25 tratamientos. La suma total de cuadrados está dada por la definición siguiente:

$$\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^n (y_{ij} - \bar{y}_{..})^2 = n \sum_{i=1}^k (\bar{y}_i - \bar{y}_{..})^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^n (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$$

Esta ecuación muestra que la variabilidad total en los datos, puede dividirse en una suma de cuadrados de diferencias entre las medias de los tratamientos y la media total, y en una suma de cuadrados de las diferencias de las observaciones dentro de un tratamiento con respecto a la media del tratamiento. Las diferencias observadas entre las medias de los cinco tratamientos y la media total miden las diferencias entre los tratamientos, mientras que las diferencias de las observaciones dentro de un tratamiento con respecto a la media de éste, sólo pueden deberse al error aleatorio.

Por consiguiente, también puede escribirse:

$$SS_T = SS_{\text{Tratamientos}} + SS_E$$

donde cada término se calculó empleando las ecuaciones:

$$SS_T = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^n y_{ij}^2 - \frac{y_{..}^2}{N} = \text{suma total de cuadrados, forma de cálculo}$$

$$SS_T = \sum_{i=1}^k \frac{y_{i.}^2}{n} - \frac{y_{..}^2}{N} = \text{suma de cuadrados de los tratamientos, forma de cálculo}$$

$$SS_E = SS_T - SS_{\text{Tratamiento}} \quad \text{Suma de cuadrados del error, forma de cálculo}$$

Se calculó luego la media de cuadrados de los tratamientos:

$$MS_{\text{Tratamientos}} = \frac{SS_{\text{Tratamientos}}}{k - 1}$$

Existen k niveles del factor, así que $SS_{\text{Tratamientos}}$ tiene $k-1$ grados de libertad. Si la Hipótesis nula (H_0) es verdadera $MS_{\text{Tratamientos}}$ es un estimador insesgado de σ^2 con base a $k-1$ grados de libertad. Sin embargo si la Hipótesis alternativa (H_1) es verdadera, se tiene que el valor $MS_{\text{Tratamientos}}$ estima a σ^2 más un término adicional que mide la variación debida a los efectos sistemáticos.

Otro estimador insesgado de σ^2 , sin importar si H_0 es verdadera o no y con base en $k(n-1)$ grados de libertad, es el error cuadrático medio, dado por la expresión:

$$MSS_E = \frac{SS_E}{k(n - 1)}$$

Dentro de cualquier tratamiento existen n réplicas que proporcionan $n-1$ grados de libertad con los cuales estimar el error experimental. Dado que existen k tratamientos, se tienen $k(n-1)$ grados de libertad para el error. En la ecuación de SS_T , también existe una partición del número de grados de libertad. Es decir,

hay $kn=N$ observaciones, en consecuencia, SS_T tiene $kn-1$ grados de libertad. Finalmente, la partición de los grados de libertad es:

$$kn - 1 = k - 1 + k(n - 1)$$

Se supuso que las k poblaciones siguen una distribución normal, por lo que pudo calcular el valor F_0 :

$$F_0 = \frac{MS_{Tratamiento}}{MS_E}$$

que tiene una distribución F si H_0 es verdadera, por tanto se debe rechazar H_0 , si el valor $f_0 > f_{\alpha, k-1, k(n-1)}$.

Los resultados del ANOVA se presentaron en una tabla de análisis de varianza (Tabla 5). También se utilizó el software MINITAB 15® para graficar los residuos y verificar el modelo.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	Fo
Tratamiento	k-1	$SS_{Tratamiento}$	$MS_{Tratamiento}$	$MS_{Tratamiento}/MS_E$
Error	k(n-1)	SS_E	MS_E	
Total	kn-1	SS_T		

TABLA 5. Tabla de análisis de varianza

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE DE POMELO.

Los valores obtenidos y las especificaciones de referencia para las propiedades físicas medidas en el aceite de pomelo (*Citrus paradisi*) se muestran en la Tabla 6.

Propiedad	Especificación (IRAM-SAIPA 18.586)	Valor Medido
Densidad mg/mL	0,852-0,860	0,8573
Índice de Refracción	1,474-1,479	1,4723
Rotación óptica	91° – 96°	91,60°

TABLA 6. Propiedades físicas del aceite de pomelo

Se puede observar que el valor de densidad relativa obtenido (0,8573) y la rotación óptica se encuentran dentro de las especificaciones dadas por la norma de calidad para el aceite de pomelo. El índice de refracción medido (1,4723), levemente inferior a lo especificado en dicha norma.

En el análisis realizado por GC/MS se identificaron 21 componentes: 9 terpenos, 3 sesquiterpenos, 2 aldehídos, 7 alcoholes, y 1 éster (lo cual representa el 99.10% de los componentes). En la Tabla 7, se muestran los componentes identificados, con los tiempos de retención y el promedio de la composición en porcentaje respectivos. Se puede observar que el limoneno, es el monoterpeno presente en mayor proporción, para este compuesto se obtuvo un 92,60%, encontrándose en el límite superior del rango reportado para aceites esenciales de cítricos. Entre los monoterpenos detectados en mayor proporción que le siguen al limoneno figuran: β -mirceno con 1,20%. Los demás componentes se encuentran en una proporción menor al 1,00%.

La composición química y los valores de las propiedades físicas del aceite esencial de pomelo obtenido se encontraron cercanos o dentro de los valores

reportados en la literatura para este tipo de aceite, y guardan correspondencia con el método de extracción empleado y la composición del mismo: alto contenido en hidrocarburos monoterpénicos, especialmente el limoneno.

Nº pico	Tr (min)	Componentes identificados	%
1	12.62	α -pineno	0.60
2	15.38	Sabineno	0.60
3	16.71	β -mirceno	1.20
4	17.38	n-octanal	0.40
5	21.21	Limoneno	92.60
6	2.46	Oxido de Linalool cis	0.10
7	23.72	Oxido de Linalool trans	0.10
8	24.19	Linalool	0.20
9	25.49	Menta-2,8-dien-1-ol trans p	0.30
10	26.27	Oxido de limoneno(Z)+ Oxido de limoneno (E)	1.30
11	27.5	β -citronelal	Trazas
12	30.17	Decanal	0.10
13	32.03	Carveol trans	0.30
14	32.87	Carveol cis	0.30
15	33.63	Carvona	0.30
16	35.33	Geranial	0.10
17	40.76	α -cubebeno	0.10
18	41.23	Acetato de Nerilo	0.10
19	43.77	β -cariofileno	0.10
20	48.58	δ -amorfenol	0.10
21	50.83	Oxido de cariofileno	0.20
Total			99.10

TABLA 7. Composición química del aceite de pomelo identificados por GC-MS

4.2. CURVAS DE CALIBRACIÓN DE LIMONENO Y TERPINEOL.

Se construyen las curvas de calibración del limoneno y terpineol utilizando butilmetilcetona como estándar interno, y patrones cromatográficos de ambos compuestos. Las curvas se muestran en las Figuras 13 y 14.

Los resultados obtenidos en los ensayos, con sus respectivos niveles se muestran en la Tabla 10.

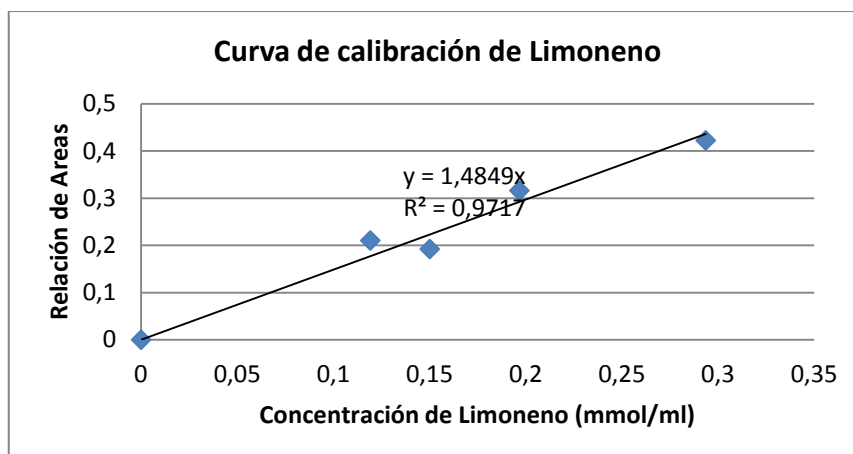


FIGURA 12. Curva de calibración del limoneno

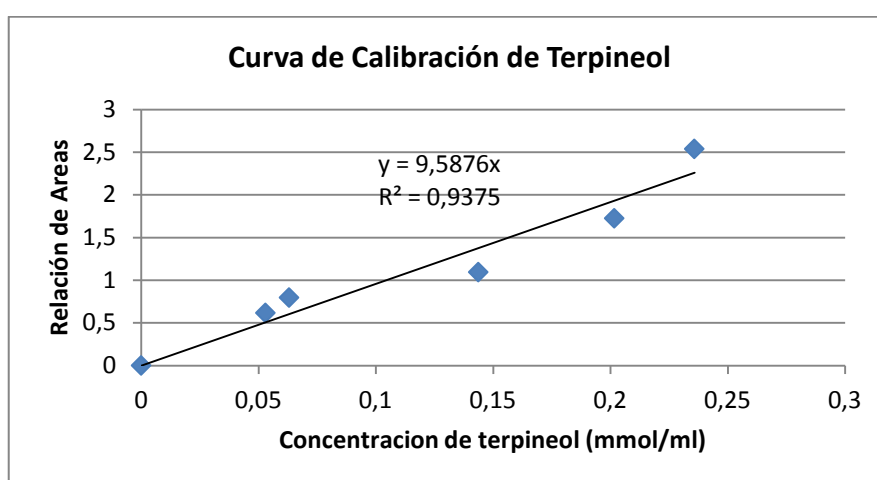


FIGURA 13. Curva de calibración de terpineol

4.3. ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados del ANOVA se resumen en las Tablas 11 y 12, donde se observan las sumas de cuadrados y la prueba de contraste F.

El valor F se obtuvo de la tabla de valores críticos de la distribución F para un nivel de significancia del 5%, con 20 grados de libertad. El valor leído fue de 5,803. Por lo que $F_o > F$ y se rechaza la Hipótesis nula. El valor p calculado por el software MINITAB® es de 0,000, menor que el valor α de 0,05 lo que indica que el factor solvente tiene un efecto significativo en el rendimiento de la reacción.

Ensayo	Solvente	Conversión de limoneno %	Selectividad a terpineol %	Rendimiento %
Y ₁₁	Sin Solvente	96,59	10,73	10,37
Y ₁₂	Sin Solvente	96,35	12,08	11,64
Y ₁₃	Sin Solvente	97,02	9,23	8,95
Y ₁₄	Sin Solvente	97,45	11,78	11,48
Y ₁₅	Sin Solvente	95,33	12,51	11,93
Y ₂₁	Alcohol Isopropilico	94,81	11,91	11,29
Y ₂₂	Alcohol Isopropilico	96,14	14,10	13,56
Y ₂₃	Alcohol Isopropilico	97,65	11,66	11,39
Y ₂₄	Alcohol Isopropilico	91,11	17,14	15,62
Y ₂₅	Alcohol Isopropilico	92,03	18,10	16,66
Y ₃₁	Acetona	92,12	18,27	16,83
Y ₃₂	Acetona	95,67	17,07	16,33
Y ₃₃	Acetona	92,07	25,26	23,25
Y ₃₄	Acetona	84,67	20,01	16,94
Y ₃₅	Acetona	87,67	26,22	22,99
Y ₄₁	Acido Acetico	92,53	13,94	12,90
Y ₄₂	Acido Acetico	97,22	11,18	10,87
Y ₄₃	Acido Acetico	97,69	8,68	8,48
Y ₄₄	Acido Acetico	96,35	9,06	8,73
Y ₄₅	Acido Acetico	96,85	8,62	8,35
Y ₅₁	Tetracloruro de Carbono	93,76	14,44	13,54
Y ₅₂	Tetracloruro de Carbono	94,14	9,51	8,95
Y ₅₃	Tetracloruro de Carbono	89,48	12,44	11,13
Y ₅₄	Tetracloruro de Carbono	94,05	9,71	9,14
Y ₅₅	Tetracloruro de Carbono	94,69	11,80	11,17

Tabla 10. Resultados de cada nivel del diseño experimental.

La suposición de normalidad de los errores se comprobó generando el gráfico de la Figura 15. Como se puede observar los residuos se ajustan alrededor de la línea recta, lo que indica normalidad de los mismos.

Niveles	Observaciones y_{ij}					Σy_{ij}	$(\Sigma y_{ij})^2$	Σy_{ij}^2	$(\Sigma y_{ij})^2/n$
y_1	10,37	11,64	8,95	11,48	11,93	54,36	2955,38	597,07	591,08
y_2	11,29	13,56	11,39	15,62	16,66	68,51	4693,89	962,40	938,78
y_3	16,83	16,33	23,25	16,94	22,99	96,35	9282,78	1906,26	1856,56
y_4	12,90	10,87	8,48	8,73	8,35	49,33	2433,14	502,34	486,63
y_5	13,54	8,95	11,13	9,14	11,17	53,93	2908,34	595,62	581,67
					$\Sigma y_{..}$	322,48		4563,69	4454,71
					$\Sigma y_{..}^2$	103992,3			
					$(\Sigma y_{..}^2)/N$	4159,69			

Tabla 11. Cálculos del ANOVA

Fuente	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	Fo	P
Tratamiento	4	295,01	73,75	13,54	0,000
Error	20	108,98	5,45		
Total	24	403,99			

Tabla 12. Tabla de análisis de varianza para el Rendimiento de reacción.

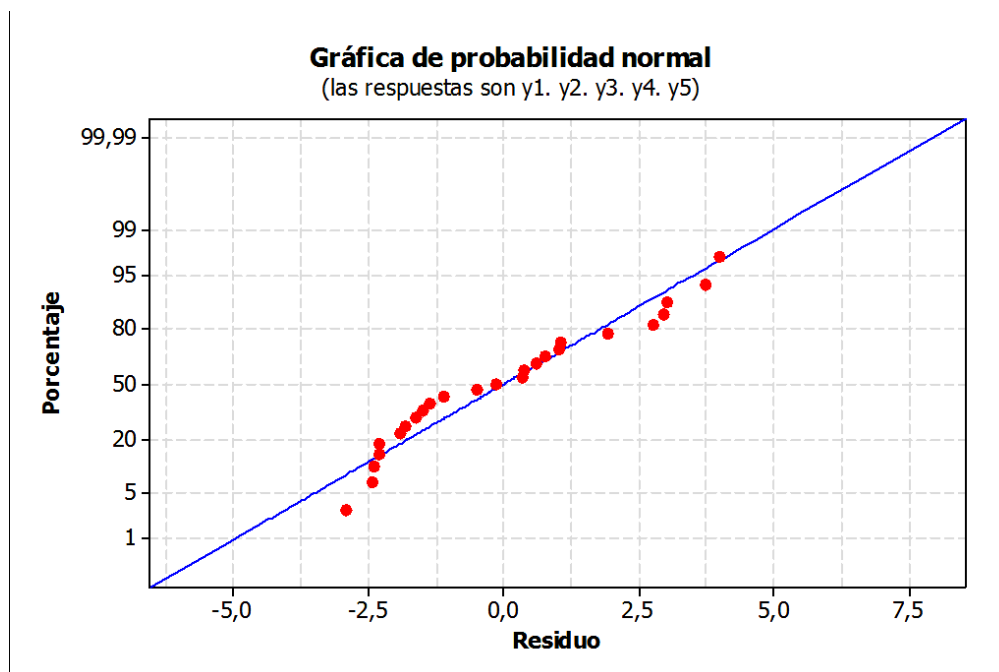
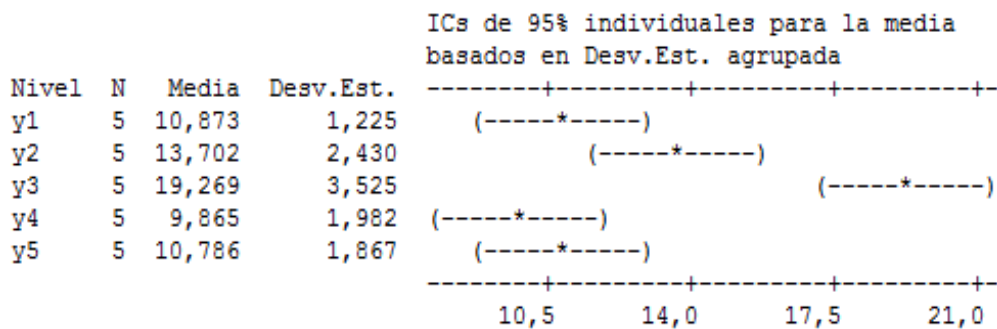


FIGURA 14. Gráfica de probabilidad normal de los residuos

Como el valor p indica una diferencia significativa en las medias, se analiza la tabla de intervalos de confianza individuales (Tabla 8). En la misma se

muestran los conjuntos de paréntesis que encierran, con un 95% de confianza, los intervalos para la media del rendimiento de cada nivel. Se puede observar que no hay superposición para los niveles 1, 2, 3 y 4 con el nivel 3, lo que sugiere también que se debe rechazar la hipótesis nula. Los intervalos de confianza para las medias de los rendimientos correspondientes a las reacciones sin solvente, con alcohol isopropílico, con ácido acético y con tetracloruro de carbono muestran que entre las mismas no existen diferencias significativas. Y todas se diferencian de la media del rendimiento de reacción con solvente acetona. Además se aprecia que los ensayos con acetona produjeron un mayor rendimiento (19,269%), aunque también con mayor desvío (3,525). El menor rendimiento medio observado fue de 9,865% correspondiente a los ensayos con ácido acético, le siguen en orden, las reacciones con tetracloruro de carbono con un valor de 10,786%, luego los ensayos sin solvente con un rendimiento medio de 10,873% y las reacciones con alcohol isopropílico con 13,702%. Además como lo muestra la Tabla 10, para el solvente acetona también corresponden los mayores valores de selectividad de la reacción a terpineol.



Desv.Est. agrupada = 2,334

TABLA 8. Tabla de intervalos de confianza individuales para las medias

En la gráfica de cajas (Figura 15) se puede observar que los valores de rendimiento del nivel 1 correspondiente a reacciones sin solvente están representados por la caja más pequeña, es decir con menor variación, y no están simétricos con respecto a la mediana. La caja más grande o con mayor variación de los datos (desvío estándar de 3,525) corresponde al nivel 3 de reacciones con acetona, tampoco sus datos son simétricos, aunque se aprecia el mayor valor de rendimiento con respecto a los otros niveles (19,27%). Los

niveles 4 y 5 pertenecientes a ensayos con ácido acético y tetracloruro de carbono respectivamente, presentan muchos valores por encima del tercer cuartil, esto se observa por el bigote superior de sus cajas. Se puede decir además que los datos más simétricos corresponden al nivel 2 de reacciones con alcohol isopropílico. Por último no se registran ningún valor de rendimiento atípico o anormal.

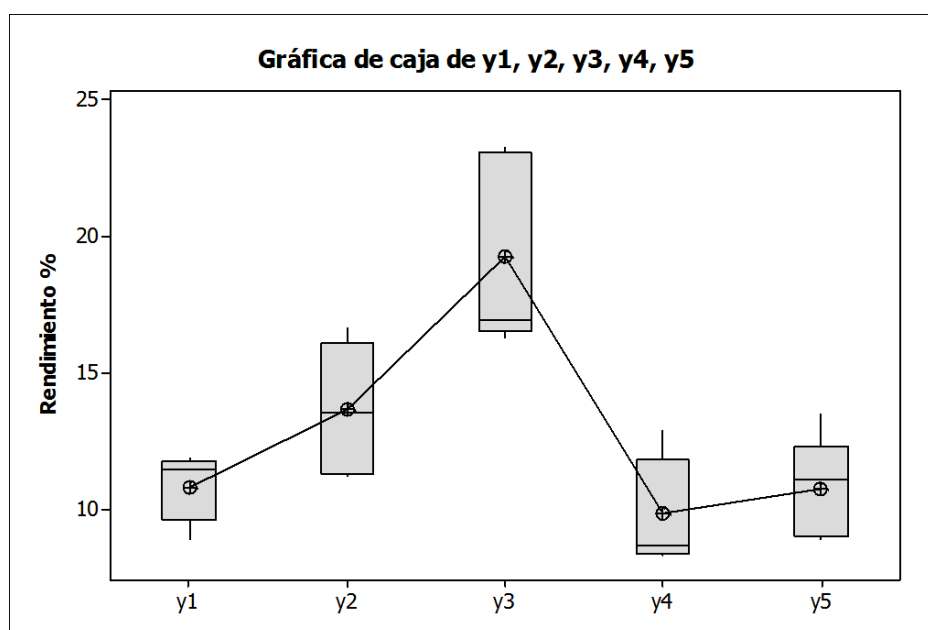


FIGURA 15. Gráfica de cajas comparativo del rendimiento porcentual de cada nivel

La evaluación de la potencia permite determinar la probabilidad de que la prueba identifique correctamente un efecto si éste existe. Se calculó la potencia del ANOVA con el programa estadístico (Tabla 9). Estos resultados muestran que para una prueba con cinco niveles y cinco muestras por nivel, con una desviación estándar de 2,3, una diferencia máxima entre las medias de los rendimientos de cada nivel de 9,4 y un $\alpha = 0,05$; la potencia de la prueba es de 99,85%. Es decir la prueba pudo detectar una diferencia máxima de 9,4 en el rendimiento de las reacciones y rechazar la hipótesis nula con un 99,85% de probabilidad con cinco observaciones de cada nivel. En la gráfica se puede observar la curva de potencia para el tamaño de muestra igual a 5. El círculo rojo

representa la potencia calculada, en la zona de potencia máxima, lo que indica una buena elección en el número de muestras o réplicas por nivel.

α	Desviación estándar asumida	Niveles	Tamaño de muestra	Potencia	Diferencia máxima
0,05	2,3	5	5	0,9985	9,4

TABLA 9. Potencia de la prueba ANOVA

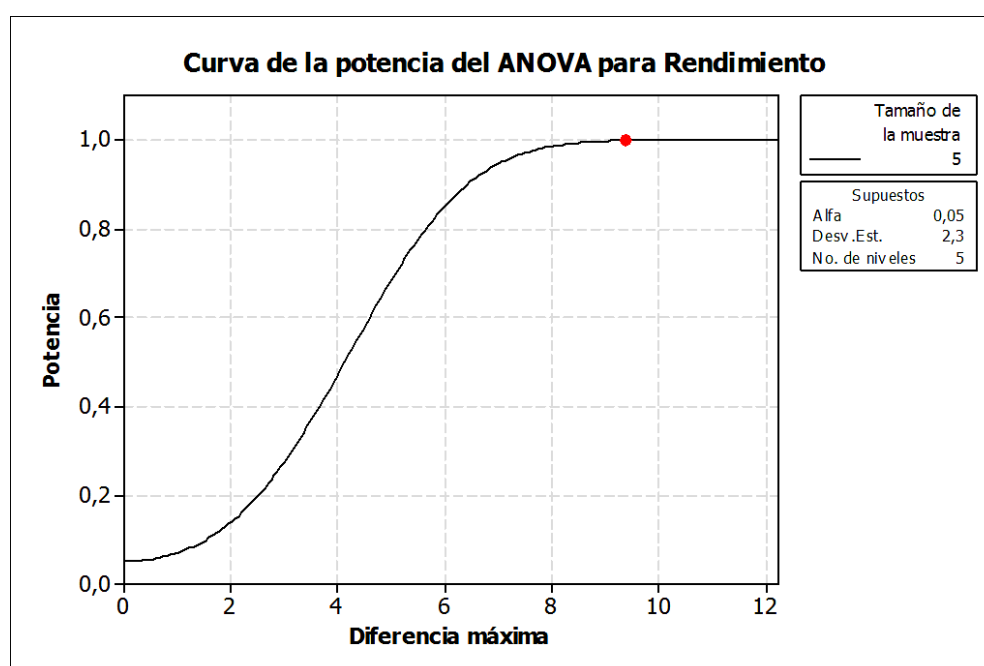


FIGURA 16. Curva de potencia para cinco observaciones

4.4. CONCLUSIONES

A través de la herramienta estadística de Análisis de la Varianza, se logró comprobar si el solvente tiene un efecto significativo en el Rendimiento de la reacción catalítica de limoneno a terpineol.

El diseño experimental aplicado permitió establecer las diferencias significativas entre los valores del rendimiento de la reacción correspondiente a los distintos niveles del factor.

La comparación de los intervalos de confianza para las medias de cada nivel aportó información para reconocer qué niveles del factor solvente difieren entre sí.

Los resultados obtenidos muestran que el rendimiento de la reacción para la obtención de terpineol puede aumentar considerablemente con el uso de un solvente aprótico como la acetona.

Se obtuvo además la potencia de la prueba donde se pudo comprobar una máxima sensibilidad de la misma para detectar diferencias entre las medias de los distintos niveles.

Por otra parte también se verificó la composición química del aceite de pomelo utilizado, que presenta una composición de limoneno cuyo valor se encuentra en el límite superior de las especificaciones.

Este trabajo demostró la utilidad de una herramienta estadística y de calidad en la resolución de un problema, en este caso dentro de un proyecto de investigación. El uso de experimentos diseñados, en este caso el unifactorial, otorgó eficiencia y economía en el proceso experimental; y el empleo de un método estadístico, como el ANOVA, para el análisis de los datos, brindó objetividad científica en la obtención de conclusiones.

Los resultados obtenidos permitirán mejorar el proceso de obtención de terpineol por hidratación catalítica del limoneno, con el uso del solvente apropiado. Es muy importante para el proyecto de investigación en el que se incluye el trabajo ya que encontrar las mejores condiciones del proceso es uno de los objetivos del mismo.

Esta metodología de estudio puede aplicarse también en la industria, donde interesa siempre obtener mejoras en los procesos de producción.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Ávila, M.; Comelli, N.; Ponzi, E.; Rodríguez-Castellón, A.; Jiménez-López, R.; Carrizo Flores, E.; Ponzi, M. (2010). Study of solid acid catalysis for the hydration of -pinene. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 322:106–112.
- Bhatia, D. M. (2008). Fragrance material review on terpineol . *Food and Chemical Toxicology* , 46: S275–S279).
- Baik, J.; Kim, S.; Lee, J.; Oh, T.; Kim, J.; Lee, N.; Hyun, C. (2008). Chemical composition and biological activities of essential oils extracted from Korean endemic Citrus species. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(1):74-79.
- Ballerini, G.; Chamorro, E.; Sequeira, A.; Morales, W.; Velasco, G. (2004). Aceite Esencial de tagetes minuta para el control de Varroa jacobsoni. *Sociedad de Biología de Rosario. VI Congreso. Libro de Resúmenes UNR*.
- Ballerini, G.; Chamorro, E.; Sequeira, A.; Morales, W.; Velasco, G. (2005). Essential oil from Tagetes minuta for Varroa jacobsoni control: Laboratory test. *Biocell*, 29 (1):119.
- Bandoni, A. (2003). *Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica: su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores*. CYTED.
- Bathia, S.; Mc Ginty, D.; Foxenberg, R.; Letizia, C.; Api, A. (2008). Fragrance material review on terpineol. *Food and Chemical Toxicology* , 46: S275–S279.
- Berger, R. (2007). *Flavours and Fragrances. Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*. Hannover, Germany: Springer.
- Bertero, N.; Trasarti, A.; Apesteguía, C.; Marchi, A. (2011). Solvent effect in the liquid-phase hydrogenation of acetophenone over Ni/SiO₂:A comprehensive study of the phenomenon. *Applied Catalysis A General*, 394:228–238.
- Brenes, A.; Roura, E. (2010). Essential oils in poultry nutrition: main effects and modes of action. *Anim. Feed Sci. Technol*, 158:1–14.
- Bruzzone, I. (2008). *Aceite Esencial de limon*. Bs. As.: Dirección de Industria Alimentaria y Agroindustrias .
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. *Int. J. Food Microbiol.* , 94:223-253.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. A review. *Int. J. Food Microbiol.*, 94:223–253.
- Carson, C.; Hammer, K. (2011). Chemistry and Bioactivity of essential oils. En H. Editor: Thormar, *Lipids and essential oils as antimicrobial agentes* (págs. 203-223). Reykjavik, Iceland: WILEY.
- Castellanos Molina, R. (2007). Biotransformación de limoneno, α -pineno y aceites esenciales de Naranja y mandarina empleando *Aspergillus niger*. Universidad Industrial de Santander.
- Cerutti, M. N. (2004). Introducción a la obtención de aceite de limón. *Invenio*, 7(12):149-155.

- Chalk, A. (1988). *Catalysis of Organic Reactions*. New York: Marcel Dekker.
- Chamorro, E.; Ballerini, G.; Sequeira, A.; Velasco, G. (2008). Chemical variability of essential oil from *Tagetes minuta* leaves and flowers. *J. Argent. Chem. Soc.*, 96: 80-86.
- Dellacassa. (2010). *Normalización de Productos naturales obtenidos de especies de la flora aromática Latinoamericana*. Porto Alegre: ediPUCRS.
- Devore, J. (2009). *Probabilidad y Estadística para Ingeniería y Ciencias*. México: CENGAGE Learning.
- Dewick, P. (2009). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. Chennai, India: John Wiley and Sons.
- Ege, S. (1997). *Química Orgánica: estructura y reactividad*. Reverte.
- Erman, E. (1985). *Chemistry of the monoterpenes, an Encyclopedic Handbook*. New York: Marcel Dkker.
- Espina, S.; Conchello, P.; García, D.; Pagán, R. (2011). Chemical composition commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined. *Food Control*, 22:896-902.
- Essam, E. (2001). Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 130:325-337.
- Exportar, F. (2002). *Informe mensual de la Fundación Export.ar. Análisis de la Tendencia del Mercado Internacional aceites Esenciales*. Buenos Aires.
- Eyler, G.; Cañizo, A. I.; Mateo, C. (2004). Efecto del solvente sobre la descomposición térmica de trans-3,6-dimetil-3,6-difenil-1,2,4,5-tetraoxaciclohexano en solución. *Quim. Nova*, 27(6):920-924.
- Flesch, G.; Rohmer, M. (1988). Prokaryotic hopanoids: the biosynthesis of the bacteriohopane skeleton. *European Journal of Biochemistry*, 175(2):405-411.
- Flick, E. (1998). *Industrial Solvent Handbook. 5thEd.* New Jersey, U.S.A.: Noyes Data Corporation Westwood.
- Fraenkel, G. (1959). The raison d'être of secondary plant substances. *Science*, 129:1466-1470.
- Garay, R. (2010). Sistemas de Normalización y sus beneficios en el desarrollo del sector de las plantas y sus derivados. En E. Dellacassa, *Normalización de productos naturales obtenidos de especies de la flora aromática de Latinoamérica* (págs. 301-310). Porto Alegre: EDIPUCRS.
- George, D.; Smith, T.; Shiel, R.; Sparagano, O.; Guy, J. (2009). Mode of action and variability in efficacy of plant essential oils showing toxicity against the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. *Vet. Parasitol.*, 161:276-282.
- Gomes, M.; Cardoso, M.; Soares, M.; Batista, L.; Machado, S.; Andrade, M.; Rodrigues, L. (2014). Use of Essential Oils of the Genus *Citrus* as Biocidal Agents. *American Journal of Plant Sciences*, 5:299-305.
- Grayson, D. (2000). Monoterpenoids. *Natural Products Reports*, 17:385-419.

- Günther, E. (1961). History- Origin in plants productions- Analysis. En E. Günther, *The Essential Oils*. (pág. Volume I.). Toronto, Canada: D. Van Nostrand Company, Inc.
- Gutierrez, J.; Barry Ryan, C.; Bourke, P. (2008). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *Int. J. Food Microbiology*, 124:91-97.
- Gutierrez, M.; Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín INTEXTER (UPC)*, N°122.
- Hidalgo-Carrillo, J., Aramendía, M., Marinas, A., Marinas, J., & Urbano, F. (2010). Support and solvent effects on the liquid-phase chemoselective hydrogenation of crotonaldehyde over Pt catalysts. *Applied Catalysis A General*, 385:190-200.
- Husnu Can Baser, K.; Buchbauer, G. (2010). *Handbook of essential oils. Science, technology and applications*. New York: CRC PRESS. Taylor & Francis Group.
- IRAM SAIPA, 18586. (1970). Aceite esencial de pomelo.
- Keterton, L.; Mac Duff, C. (1971). Florida Citrus Oils. *University of Florida. Gainesville Florida Tech*, N° 452.
- Kirbaslar, S.; Boz, I., & Kirbaslar, F. (2006). Composition of Turkish lemon and grapefruit peel oils. *J. Essent. Oil Res.*, 18:525-543.
- Król, S.; Skalicka-Woźniak, K.; Kandefer-Szerszeń, M.; Stepulak, A. (2013). The biological and pharmacological activity of essential oils in the treatment and prevention of infectious diseases. *Avances en Higiene y Medicina Experimental*, 67:1000-1007.
- Lemos Bicas, J.; Fontanille, P.; Pastore, G.; Larroche, C. (2010). A bioprocess for the production of high concentrations of R-(+)- α -terpineol from R-(+)-limonene. *Process Biochemistry*, 45:481-486.
- Maguna, F., Romero, A., Garro, O., & Okulik, N. (2006). Actividad antimicrobiana de un grupo de terpenoides. *UNNE, Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*, 57.
- Matsubara, K.; Tanaka, M.; Urata, T.; Fukunaga, M.; Kuwata, K.; Takahashi, N. (1987). *Chem. Abstr.*, 18.
- Meuldijk, J.; Joosten, G.; Stamhuis, E. J. (1986). Effect of solvent on the hydration of 2-methylpropene in solutions of p-toluenesulfonic acid and polystyrenesulfonic acid. *Journal of Molecular Catalysis*, 37(1):75-92.
- Montgomery, D.; Runger, G. (2002). *Probabilidad y Estadística aplicadas a la Ingeniería*. Mexico: McGraw-Hill.
- Mukherjee, S.; Vannice, M. (2006). Solvent effects in liquid-phase reactions. Activity and selectivity during citral hydrogenation on Pt/SiO₂ and evaluation of mass transfer effects. *Journal of Catalysis*, 243:108-130.
- Oussalah, M.; Caillet, S.; Saucier, L.; Lacroix, M. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: E. coli O157:H7, Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes. *Food Control*, 18, 414-420.

- Oyedemi, S.; Okoh, A.; Mabinya, L.; Pirochenva, G.; Afolayan, A. (2009). The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol, -terpineol and g-terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. *African Journal of Biotechnology*, 8 (7), pp1280-1286.
- Pino, J.; Acevedo, A.; Rabelo, C.; González, C.; Escandón, J. (1999). Composition of Distilled Grapefruit Oil. *J. Essent. Oil. Res.*, 11 (1):75-76.
- Porter, J.; Spurgeon, S. (1981). *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds*. New York: Wiley Interscience Publication.
- Reichardt, C. (2004). *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry, 3th Ed.* WILEY-VCH.
- Rodríguez Álvarez, M.; Alcaraz Meléndez, L.; Real, C.; Sergio, M. (2012). *Procedimientos para la Extracción de Aceites Esenciales en Plantas Aromáticas*. México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Rojas, J.; Perea, A.; Stashenko, E. (2009). Obtención de aceites esenciales y pectinas a partir de subproductos de jugos cítricos. *VITAE, Revista de la facultad de Química Farmacéutica*, 16:1,110-115.
- Román Aguirre, M.; De la Torre Sáenz, L.; Antúnez Flores, W.; Robau Sánchez, A.; Aguilar Elguézabal, A. (2005). Synthesis of terpineol from α -pinene by homogeneous acid catalysis. *Catalysis Today*, 107-108:310-314.
- Romero Marquez, M. (2004). *Plantas Aromáticas*. Kier.
- Santinoni, L.; Silva, N.; Córdoba, L. (2012). *Descripcion de cultivares de pomelo (Citrus paradisi Macf.) en el Valle Central de Catamarca*. Catamarca: INTA.
- Schmid, R. (2001). Effect of Solvent on Chemical Reactions and Reactivity. En G. Wypych, *Handbook of Solvents* (págs. 13:736-846). Vienna, Austria: Technical University of Vienna. Institute of Inorganic Chemistry.
- Schmidt, E. (2010). Production of Essential Oils. En K. B. Baser, *Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications*. (págs. 83-120). New York: CRC PRESS. Taylor & Francis Group.
- Schnitzler, P.; Astani, A.; Reichling, J. (2011). Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, PMID: 253643.
- SENASA, S. N. (2012). *Pomelo. El cultivo del pomelo (citrus paradisi) en la Argentina*. Bs. As.
- Silva, F.; Ferreira, S.; Duarte, A.; Mendonça, D.; & Domingues, F. (2011). Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin. *B. Phytomedicine*, 19,42-47.
- Soto, L.; Ojeda de Rodriguez, G.; Rojas, L.; Sulbarán, B.; Peña, J.; Berradre, M.; Fernández, V. (2013). Caracterización química del aceite esencial de toronja (*citrus paradisi* L). *Revista Facultad de Agronomía (LUZ)*, 30:266-283.
- Stolle, A.; Schmöger, C.; Ondruschka, B.; Bonrath, G.; Keller, W.; Jandt, C. (2011). Liquid Phase Hydrogenation of Benzalacetophenone: Effect of Solvent, Catalyst Support, Catalytic Metal and Reaction Conditions. *Chinese Journal Of Catalysis*, 32:1312-1322.

- Tajkarimi, M.; Ibrahim, S.; Cliver, D. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21:1199–1218.
- Tan, Q.; Day, D.; Cadwallader, K. (1998). La bioconversión de (R)-(+)-limoneno por *P. digitatum* (NRRL 1202). *Process Biochemistry*, 29.
- Thomas, A.; Bessiere, Y. (1989). Limonene. *Natural Product Reports*, 291-309.
- Traynor, R.; Albert, R.L. (1989). *Naval Stores*. New York: Pulp Chemical Association.
- UIA. (2006). *Frutas Cítricas (Limón, mandarina y naranja)*. Corrientes, Entre Ríos y Tucumán. Buenos Aires.
- Union Industrial Argentina. (2007). *Cadena de Cítricos en la Región Noroeste*. Salta: 6º Foro Federal de la Industria. Region Noroeste.
- Vila, R.; Cañigueral, S. (2006). El aceite esencial de *Malaleuca alternifolia* en el tratamiento de la vulvovaginitis. *Revista de fitoterapia*, 6(2):119-128).
- Vital, J.; Ramos, A.; Silva, I.; Castanheiro, J. (2001). The effect of alpha-terpineol on the hydration of alpha-pinene over zeolites dispersed in polymeric membranes. *Catalysis Today*, 67:217-223.
- Viuda-Martos, M.; Ruiz-Navajas, Y.; Fernández-López, J.; Pérez-Álvarez, J. (2008). Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control*, 19:1130-1138.
- Walpole, R.; Myers, R.; Myers, S.; Ye, K. (2007). *Probabilidad y Estadística para Ingeniería y Ciencias*. México: PEARSON Prentice Hall.
- Welsh, F.W.; Murray, W.D.; Williams, R.E. (1989). Microbiological and enzymatic production of flavour and fragrance chemicals. *Critical Reviews Biotechnology*, 9:105.
- Yadav, M; Patil, M.; Jasra, R. (2009). Acetoxylation and hydration of limonene and pinene using cation exchanged zeolite beta. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 297:101–109.

6. ANEXOS

- Anexo 1: “Flujo Operativo de la Reacción de obtención de terpineol”
- Anexo 2: Tabla de valores F de Fisher
- Anexo 3: Cromatografía gaseosa de la reacción de hidratación de limoneno a terpineol con solvente acetona.