

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

**"Aislamiento y caracterización experimental y computacional de eugenol en
Albahaca de sal (*Ocimum basilicum*) y Albahaca de dulce (*Ocimum americanum*)"**

**Disertación para la obtención del título de licenciado en Ciencias
Químicas con mención en Química Analítica**

JUAN FRANCISCO ALMEIDA LUDEÑA

Quito, 2014

CERTIFICADO

Yo, Dra. Lorena Meneses Olmedo Directora de la disertación, CERTIFICO: Que el señor Juan Francisco Almeida Ludeña ha realizado la investigación sobre el tema "Aislamiento y caracterización experimental y computacional de eugenol en Albahaca de sal (*Ocimum basilicum*) y Albahaca de dulce (*Ocimum americanum*)" de acuerdo a las normas y técnicas establecidas.

Una vez concluido y revisado el trabajo, conforme con las disposiciones reglamentarias, autorizo la presentación del informe respectivo.

Fecha: Quito, 21 de Noviembre del 2014

Dra. Lorena Meneses Olmedo

DIRECTORA

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer a Dios, la vida, el universo por todas las maravillas que me encuentro día a día en mi camino.

Gracias a la mujer maravillosa que potencia mis cualidades, que me enseña la bondad, el desprendimiento, la entrega absoluta, el amor incondicional, que me demuestra todos los días que una mirada, una sonrisa, una caricia son la clave para empezar con ánimo un nuevo día. Gracias por tanto amor Viviana, mi "negrita".

Gracias a mis padres por todo su apoyo y amor incondicional, por estar junto a mí en todos los momentos de mi vida, por enseñarme a volar y permitirme perseguir mis sueños.

Gracias a mis hermanos Álvaro y Adrian por ser siempre incondicionales conmigo, por compartir mis triunfos y aprendizajes, por ser siempre mis silenciosos testigos en la lucha por un sueño.

Gracias a mis abuelitos por todas sus bendiciones y amor inagotable de toda la vida, es un privilegio tenerlos en mi vida.

Gracias a mis tíos, suegros, cuñados y toda mi familia en general, por todo el apoyo, por estar siempre pendientes de mis avances profesionales, artísticos y personales, es fundamental sentir siempre el respaldo de tanta gente maravillosa a mi alrededor.

Gracias a mis amigos por ser inspiración, apoyo, ejemplo en todos los campos en los que siempre hemos estado juntos me siento afortunado de tenerlos en mi vida Felipe, Guillermo, Sofía, Hilda, Andrés, Pamela y todos quienes han caminado junto a mí.

Gracias al maestro de mi vida, que me ha permitido conocer muchos lugares y personas, que me ha enseñado el valor de seguir los sueños, que me ayudó a crecer y sentirme vivo cada momento que estoy frente a él, al ser que más admiración me produce en la naturaleza, con quien entendí el arte y la pasión. Gracias al animal más majestuoso de la creación "El toro bravo".

A mis profesores de la Escuela de Ciencias Químicas por todo su apoyo, por transmitirme sus conocimientos, por hacer de mi un gran profesional.

Gracias Doctora Lorena Meneses por su apoyo, su preocupación, ejemplo de rectitud y entrega, por haberme brindado su confianza y valiosa ayuda.

Juan Francisco

A MI MÁS VALIOSO TESORO

Mi familia, mi amada esposa Viviana y mi hijo Julián Ignacio, tenerlos junto a mí es la manifestación de Dios en mi vida. Son inspiración para cada día ser un mejor ser humano.

Con amor incondicional,

Juan Francisco

"Hay hombres que luchan un día y son buenos. Hay otros que luchan un año y son mejores. Hay quienes luchan muchos años, y son muy buenos. Pero hay los que luchan toda la vida, esos son los imprescindibles"

Bertolt Brecht

TABLA DE CONTENIDO

PORTADA	i
CERTIFICACION	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
TABLA DE CONTENIDOS	vii
LISTA DE TABLAS	xi
LISTA DE DIAGRAMAS, ESQUEMAS Y FIGURAS.....	xii
LISTA DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN.....	5
CAPÍTULO I.....	8
1. MARCO TEÓRICO	8
1.1 ALBAHACA DE SAL (<i>Ocimum basilicum</i>)	8
1.1.1 DESCRIPCIÓN	8
1.1.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	9
1.1.3 USOS DE LA ALBAHACA DE SAL	10
1.2 ALBAHACA DE DULCE (<i>Ocimum americanum</i>)	11
1.2.1 DESCRIPCIÓN	11
1.2.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	13

1.2.3 USOS DE LA ALBAHACA DE DULCE	13
1.3 FENILPROPANOIDES	14
1.4 EUGENOL	16
1.4.1 DESCRIPCIÓN.....	16
1.4.2 USOS: VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL EUGENOL	17
1.5 QUÍMICA COMPUTACIONAL.....	18
1.5.1 INTRODUCCIÓN A LA QUÍMICA COMPUTACIONAL	18
1.5.2 MÉTODOS COMPUTACIONALES	19
1.5.3 APROXIMACIONES	20
1.5.4 MÉTODO AB INITIO	21
1.5.5 TEORÍA DEL FUNCIONAL DE LA DENSIDAD	21
1.5.6 FUNCIONES DE BASE	22
1.5.7 OPTIMIZACIÓN GEOMÉTRICA	22
1.5.8 FRECUENCIAS VIBRACIONALES.....	22
1.5.9 APLICACIONES DE QUÍMICA COMPUTACIONAL.....	23
CAPÍTULO II.....	24
2. MÉTODOS Y MATERIALES.....	24
2.1 PROCEDIMIENTO ANALÍTICO.....	24
2.1.1 TOMA DE MUESTRA.....	24
2.1.2 TÉCNICAS ANALÍTICAS	25
2.1.2.1 EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL	26
a) DESTILACIÓN DIRECTA POR ARRASTRE DE VAPOR	26

b) DESTILACIÓN POR ARRASTRE DE VAPOR, MÉTODO VAPOR VIVO ..	28
c) EXTRACCIÓN SOXHLET	29
2.1.2.2 AISLAMIENTO DE EUGENOL.....	31
a) REACCIONES ÁCIDO-BASE.....	31
b) PROCEDIMIENTO DE AISLAMIENTO DE EUGENOL	32
2.1.2.3 CARACTERIZACIÓN INSTRUMENTAL DE EUGENOL.....	33
a) INSTRUMENTACIÓN.....	33
b) ESPECTROFOTOMETRIA UV/VIS	34
c) ESPECTROFOTOMETRIA DE INFRARROJOS (IR).....	36
• ATR	38
• INTERPRETACIÓN DE ESPECTROS IR	39
d) ANALISIS COMPUTACIONAL	39
2.2 ANALISIS ESTADISTICO	40
2.2.1 TRATAMIENTO DE RESULTADOS	40
2.2.2 ANÁLISIS DE VARIANZAS (ANOVA)	41
 CAPÍTULO III	 43
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
3.1 MUESTREO.....	43
3.2 TRATAMIENTO DE MUESTRAS.....	44
3.3 EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL	45
3.4 AISLAMIENTO DEL EUGENOL	47

3.5 CARACTERIZACIÓN DEL EUGENOL.....	57
CAPÍTULO IV	63
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	63
4.1 CONCLUSIONES.....	63
4.2 RECOMENDACIONES	64
BIBLIOGRAFÍA	66
ANEXOS.....	72

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1 Resumen de operaciones para ANOVA	41
Tabla 3.1 Pesos promedio de aceite esencial para cada tipo de extracción	46
Tabla 3.2 Rendimiento de eugenol obtenido por destilación directa por arrastre de vapor en albahaca de sal (<i>Ocimum basilicum</i>)	48
Tabla 3.3 Rendimiento de eugenol obtenido por destilación por arrastre de vapor método vapor vivo en albahaca de sal (<i>Ocimum basilicum</i>).....	50
Tabla 3.4 Rendimiento de eugenol obtenido por extracción soxhlet en albahaca de sal (<i>Ocimum basilicum</i>).....	51
Tabla 3.5 Rendimiento de eugenol obtenido por destilación directa por arrastre de vapor en albahaca de dulce (<i>Ocimum americanum</i>)	52
Tabla 3.6 Rendimiento de eugenol obtenido por destilación por arrastre de vapor método vapor vivo en albahaca de dulce (<i>Ocimum americanum</i>)	53
Tabla 3.7 Rendimiento de eugenol obtenido por extracción soxhlet en albahaca de dulce (<i>Ocimum americanum</i>).....	54
Tabla 3.8 Análisis de varianza de los tres métodos de extracción utilizados para la albahaca de sal (<i>Ocimum basilicum</i>)	55
Tabla 3.9 Análisis de varianza de los tres métodos de extracción utilizados para la albahaca de dulce (<i>Ocimum americanum</i>).....	56
Tabla 3.10 Comparación de principales picos entre espectro instrumental del estándar de eugenol y espectros computacionales.....	61

LISTA DE DIAGRAMAS, ESQUEMAS Y FIGURAS

Diagrama 2.1 Componentes básicos de un espectrofotómetro.....	33
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 <i>Ocimum basilicum</i>	9
Figura 1.2 <i>Ocimum americanum</i>	12
Figura 1.3 Biosíntesis del ácido shikímico	15
Figura 1.4 Breve resumen de la ruta del ácido shikímico	16
Figura 1.4 División de los métodos computacionales	20
Figura 2.1 Equipo de destilación directa por arrastre de vapor	27
Figura 2.2 Equipo de destilación por arrastre de vapor, método vapor vivo	29
Figura 2.3 Equipo de extracción soxhlet	30
Figura 2.4 Vibraciones de tensión y flexión por acción de energía electromagnética	37
Figura 3.1 Espectro IR de estándar de eugenol marca Aldrich	58
Figura 3.2 Comparación de espectros entre una muestra de albahaca de sal y el estándar .	59
Figura 3.3 Espectro IR obtenido mediante software Gauss View 4.1.2 y Gaussian 03	62

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 Absorciones características de algunos grupos funcionales	73
Anexo 2 Certificado de análisis Eugenol Sigma - Aldrich	75
Anexo 3 Tabla de distribución t de Student	77
Anexo 4 Tabla de distribución F con confianza del 95%	79
Anexo 5 Espectros IR de muestras y duplicados de albahaca de sal y albahaca de dulce	81

RESUMEN

En el presente trabajo se tuvo como objetivo principal el aislamiento y la caracterización experimental y computacional de eugenol en la albahaca de sal (*Ocimum basilicum*) y la albahaca de dulce (*Ocimum americanum*).

Se utilizaron tres técnicas para la extracción del aceite esencial de las hojas y flores: destilación por arrastre de vapor, destilación directa y extracción Soxhlet. Posteriormente, por medio de reacciones ácido-base y solubilidad, se aisló el eugenol del resto de componentes presentes en el aceite esencial.

La segunda etapa fue la caracterización del eugenol por medio de técnicas analíticas tales como espectroscopia de infrarrojos y espectroscopía ultravioleta y visible, contrastando los resultados obtenidos de las muestras con un estándar de eugenol.

Los espectros obtenidos principalmente en la zona de infrarrojos permitieron caracterizar al eugenol obtenido de las dos clases de albahaca, esto debido a que esta técnica nos permite identificar un compuesto con un alto grado de seguridad. Por ello las técnicas espectroscópicas tienen un uso muy amplio y confiable.

El trabajo computacional consistió en la obtención de los espectros de infrarrojos y ultravioleta/visible utilizando el software Gauss View 4.1.2 y Gaussian 03 para compararlos con los correspondientes espectros de las diferentes muestras analizadas, para ello se utilizó el método de cálculo B3LYP y el conjunto de bases 6-311g.

Se determinó que el porcentaje de eugenol presente en los dos tipos de albahaca es muy bajo, sin embargo hay que destacar que la albahaca de sal posee un porcentaje mayor que la albahaca de dulce, llegando a obtenerse un 0.04% de eugenol.

En conclusión, la cantidad de eugenol que se pudo obtener de estos dos tipos de albahaca está entre un 0,02% y 0,04% con respecto al peso de albahaca fresca usado en las extracciones, en términos de rendimiento la extracción soxhlet presenta un mayor porcentaje, pero al mismo tiempo la cantidad de solvente necesario es muy alta y esto no es económico y tampoco amigable con el medio ambiente.

La extracción por arrastre de vapor presenta un mejor resultado tomando en consideración dos factores: la cantidad total de solvente necesario para el aislamiento de eugenol y el porcentaje que podemos obtener, siendo de un 0,03% con respecto al peso de muestra fresca. Los espectros de infrarrojos guardan relación entre ellos teniendo una correlación de 99,79% el espectro computacional y el estándar, mientras que las muestras en promedio tienen un 96,61% para la albahaca de sal y 94,12% la albahaca de dulce, comparadas con el mismo estándar.

Palabras clave: Eugenol, albahaca de sal, albahaca de dulce, solubilidad, espectroscopía de infrarrojos, espectroscopía ultravioleta/visible.

ABSTRACT

This work had as main objective the isolation and experimental and computational characterization of eugenol in salt basil (*Oscimum basilicum*) and sweet basil (*Ocimum americanum*).

Extraction of essential oil from the leaves and flowers was performed with 3 techniques: steam distillation, direct distillation and Soxhlet extraction. By means of acid-base reactions and solubility, eugenol was isolated from other components in the essential oil.

The second step was the characterization of eugenol using instrumental techniques such as infrared and ultraviolet/visible spectroscopy. The results obtained from the samples were compared with a standard of eugenol.

Infrared spectra allowed the characterization of eugenol obtained from two kinds of basil. This technique allows us to identify a compound with a high degree of security. Therefore spectroscopic techniques have a wide and reliable use.

The computational work consisted in the calculation of infrared and ultraviolet / visible spectra. Gauss View 4.1.2. and Gaussian 03 software was used for comparison with the corresponding spectra of the various samples tested. The method of calculation B3LYP and basis set 6-311g were used.

It was found that the percentage of eugenol in the two types of basil is very low, however, it should be noted that salt basil has a higher percentage than sweet basil, reaching 0.04% of eugenol.

In conclusion, the amount of eugenol that can be obtained from these two types of basil is between 0.02% and 0.04% as fresh basil weight; regarding performance, soxhlet extraction shows higher yield, but it is not economical and nor environmental friendly due to the amount of solvent required.

Steam stripping shows better results taking into account two factors: the total amount of solvent required for the isolation of eugenol and final yield. Infrared spectra had 99.79% of correlation between computational and standard spectrums, while samples rendered an average correlation of 96.61% for salt basil and 94.12% for sweet basil compared with the same standard.

Keywords: Eugenol, salt basil, sweet basil, solubility, infrared spectroscopy, ultraviolet/visible spectroscopy.

INTRODUCCIÓN

Existe una gran variedad de plantas que entran en la descripción general de albahaca, puesto que es una especie que tiene muchos quimiotipos naturales distintos [1]. En términos generales la importancia de la albahaca está dada debido a su uso en gastronomía y en el campo de la medicina tradicional, se han realizado estudios que confirman su actividad antibacteriana, antifúngica, analgésica, antiespasmódica, carmitiva, entre otras [2].

El mercado para comercializar la albahaca es muy diverso, ya que su uso se ha difundido a nivel mundial y en diferentes presentaciones, tanto fresca como seca, así como su aceite esencial. Los principales importadores de albahaca son países europeos como Alemania, Francia, Reino Unido y Holanda; en América el principal comprador es Estados Unidos de Norte América [3].

En nuestro país la albahaca de sal se la emplea en la gastronomía, mientras que la albahaca de dulce se la utiliza como parte de la medicina tradicional para baños curativos.

Este estudio se orientó al aislamiento y caracterización de eugenol en la albahaca de sal y de dulce que se encuentra en los mercados populares de la ciudad, analizándolas tal cual se expenden y son utilizados sin ningún tipo de tratamiento previo. Se obtuvo el aceite esencial por tres métodos distintos, siendo estos: arrastre de vapor, extracción con hexano con un equipo soxhlet y destilación acuosa directa.

El aislamiento de eugenol se realizó por medio de reacciones ácido-base teniendo en consideración la naturaleza química de la molécula de eugenol. La separación del resto de componentes del aceite esencial se la realizó por medio de solubilidad.

Las técnicas de caracterización utilizadas fueron: la espectroscopía de infrarrojos, con la que se obtuvo el espectro de cada una de las muestras y su correspondiente duplicado; y la espectroscopía ultravioleta/visible que ayudó a caracterizar el eugenol total obtenido de las cinco muestras de cada tipo de albahaca.

La importancia del aislamiento de eugenol se basa en sus usos farmacéuticos, en el caso de la albahaca porque la obtención del fenilpropano a partir de esta es mas económica que la tradicional extracción del clavo de olor (*Eugenia caryophyllata*) [4].

Por lo anteriormente expuesto es necesario complementar el presente estudio con otros similares orientados a determinar la etapa de la planta en la que se encuentra una mayor concentración de aceite esencial y por consiguiente de eugenol, estudios que se han realizado en India, con la especie *Ocimum sanctum* [4].

En cuanto al estudio computacional realizado, se utilizaron los mejores espectros obtenidos computacionalmente en un estudio del laboratorio de Química computacional de la Escuela de Ciencias Químicas de la PUCE, mediante el software Gauss View 4.1.2. y Gaussian 03, en el que se pudo observar que el método B3LYP con base 6-311g nos permite obtener espectros de mejor calidad tanto para Infrarrojos como para UV-VIS, los mismos que fueron comparados con los obtenidos mediante las técnicas instrumentales correspondientes.

Para facilitar la búsqueda de información en el presente trabajo, el mismo está dividido en cuatro capítulos, siendo estos:

Capítulo I. Marco teórico con una descripción breve de las albahacas de sal y dulce así como del eugenol, fenilpropanoides e introducción a la química computacional, con sus respectivos sustentos bibliográficos.

Capítulo II. Materiales y procedimientos, en los que se podrá encontrar descripción de las técnicas analíticas, instrumentales y computacionales utilizadas en el desarrollo del estudio.

Capítulo III. Resultados de la investigación realizada y comparación con bibliografía

Capítulo IV. Conclusiones y Recomendaciones que se han derivado del estudio realizado

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 ALBAHACA DE SAL (*Ocimum bacilicum*)

1.1.1 DESCRIPCIÓN

La albahaca de sal u *Ocimum bacilicum* es una planta que pertenece a la familia de las Lamiaceas (*Lamiaceae*), es una planta de tipo perenne, es decir se la cultiva durante todo el año, puede llegar a medir unos 50 cm de altura, la forma de sus hojas es ovalada un tanto alargada y dentada en los bordes con glándulas de aceite. El tallo es de aspecto cuadrangular muy ramificado, tiene pequeñas flores generalmente blancas o de un color rosado muy tenue. Es una planta que expele un intenso aroma característico con cierta similitud al del clavo (*Eugenia caryophyllata*) [5].

En la Figura 1.1 podemos apreciar una ilustración de la albahaca de sal (*Ocimum basilicum*)



Figura 1.1 *Ocimum basilicum* [6]

1.1.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Subclase: *Asteridae*

Orden: *Lamiales*

Familia: *Lamiaceae*

Subfamilia: *Nepetoideae*

Tribu: *Ocimeae*

Género: *Ocimum*

Especie: *Ocimum basilicum*

1.1.3 USOS DE LA ALBAHACA DE SAL

MEDICINA TRADICIONAL

Se utiliza la albahaca generalmente fresca porque la creencia indica que seca pierde sus propiedades, *Ocimum basilicum* se dice que es estimulante, tónico, carmitiva, expectorante, diurético entre otros, para ello se la utiliza en distintas formas como: decocción, infusión, aceite esencial, inhalación y en preparados con otras plantas [5].

Se utiliza en procesos inflamatorios para aliviarlos como por ejemplo en inflamación vaginal, de matriz, de anginas e incluso su uso se extiende a molestias respiratorias tales como catarro, inflamación de garganta, tos [7]. Para el dolor de oído, también conocido como otitis, se sugiere el uso del jugo de albahaca, es decir una solución acuosa de las hojas de la planta, con la que se deben realizar lavados para calmar la molestia [8].

Incluso en la medicina tradicional de Puerto Rico se usa la infusión para aumentar la secreción de leche en mujeres con un parto reciente [9].

MEDICINA Y COSMETOLOGÍA

Se han realizado estudios para comprobar la utilidad de la albahaca en varios de los casos citados en los que se emplea en la medicina tradicional, así por ejemplo, en la Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá, se realizó un estudio in vitro de la acción relajante de una infusión al 10% de *Ocimum basilicum* sobre el Ílion de rata precontraído con KCl, este cloruro actúa sobre el musculo liso intestinal provocando un dolor abdominal, la acción de

la albahaca permite tener un relajamiento del 75% con una dosis de 3 mL. lo que justifica su uso tradicional para malestares estomacales [10].

En el campo antibacterial también existen estudios en los que se pueden apreciar resultados positivos sobre el uso de aceite esencial de albahaca en colonias de *Pseudomonas aeruginosa*, *Migula*, *Shigella sp*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y dos cepas diferentes de *Escherichia coli*. En los estudios se destaca que la presencia de compuestos como el linalol y eugenol en los extractos de la albahaca pueden ser los responsables de esta actividad sobre los microorganismos mencionados [11].

Para el área de cosmetología se emplea aceites esenciales no solo por su fragancia o efectos cosméticos, en el caso de la albahaca que contiene eugenol y linalol estos compuestos por su actividad antimicrobiana aportan sus propiedades a productos para tratamiento de acné, shampoo, tónicos y mascarillas [12].

1.2 ALBAHACA DE DULCE (*Ocimum americanum*)

1.2.1 DESCRIPCIÓN

La albahaca de dulce, como es conocida en nuestro país, u *Ocimum americanum*, tiene varios nombres por los que se la identifica en otros países por ejemplo: Albahaca americana, albahaca velluda, hoary basil, american basil. Por su nombre científico tiene sinónimos: *Ocimum africanum* Lour, *Ocimum canum* Sims [13].

Es una planta anual, perteneciente a la familia de la Lamiaceas, tiene mucha semejanza con la albahaca común, albahaca de sal u *Ocimum basilicum*, las principales diferencias de la albahaca de dulce son: el labio inferior del cáliz no se dobla hacia atrás, el tallo de la flor es más corto que el cáliz, su olor característico se asemeja al del limón o lima [14].

Puede crecer entre 30 y 100 cm de alto, el tallo y las ramificaciones tienen forma cuadrangular de coloración verde oscuro o púrpura, las hojas son lanceoladas o elípticas alargadas de 2,5 a 5 cm de largo y 1 a 2,5 cm de ancho, la inflorescencia puede medir unos 15 cm de alto [13].

En la Figura 1.2 tenemos una representación de la albahaca de dulce (*Ocimum americanum*).



Figura 1.2 *Ocimum americanum*

1.2.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Subclase: *Asteridae*

Orden: *Lamiales*

Familia: *Lamiaceae*

Subfamilia: *Nepetoideae*

Tribu: *Ocimeae*

Género: *Ocimum*

Especie: *Ocimum americanum*

1.2.3 USOS DE LA ALBAHACA DE DULCE

MEDICINA TRADICIONAL

Se utilizan las hojas de la albahaca de dulce como estimulante y por sus propiedades carminativas y emenagogas, es decir que ayuda a la circulación en el área de la pelvis y en algunos casos fomentar la menstruación. El zumo de las hojas se usa para tratar molestias en los oídos (otitis) [15,16].

En nuestro país su uso tradicional principalmente tiene que ver con baños curativos, baños de suerte o aromáticos, creencias propias de nuestra cultura ancestral que hasta ahora se conserva en los mercados de la ciudad.

COSMETOLOGÍA

El aceite esencial proveniente de las hojas y flores de albahaca de dulce (*Ocimum americanum*) se utiliza en cosmetología como parte del perfume de jabones y cosméticos, además se lo emplea porque el aceite inhibe el crecimiento del bacilo tuberculoso [17].

1.3 FENILPROPANOIDES

En el presente estudio es importante mencionar a los fenilpropanoides debido a que el eugenol pertenece a este tipo de compuestos.

Son un amplio grupo de compuestos orgánicos presentes en los aceites esenciales, son derivados fenólicos, producto del metabolismo secundario de las plantas superiores. Su estructura básica consta de un anillo aromático y tienen sustituciones de al menos un grupo hidroxilo [18].

Los fenilpropanoides están relacionados con dos aminoácidos: la fenilalanina y la tirosina, pero muchos de los compuestos de este grupo provienen de la ruta bioquímica del ácido shikímico [19]. Esta es la principal ruta de biosíntesis de compuestos fenólicos en las plantas, el inicio de la ruta proviene de reacciones entre la D-eritrosa4-p y el ácido fosfoenopirúvico para formar el ácido shikímico [20]. Este ácido fue descrito por primera

vez en 1885 cuando se lo aisló de la planta asiática Shikimi-Noki (*Illicium sp.*), por ello este ácido lleva el nombre alusivo a la planta de la que fue extraído [21]. En la Figura 1.3 podemos apreciar la biosíntesis para la obtención del ácido Shikímico a partir de la D-eritrosa4-P y el ácido fosfoenpirúvico.

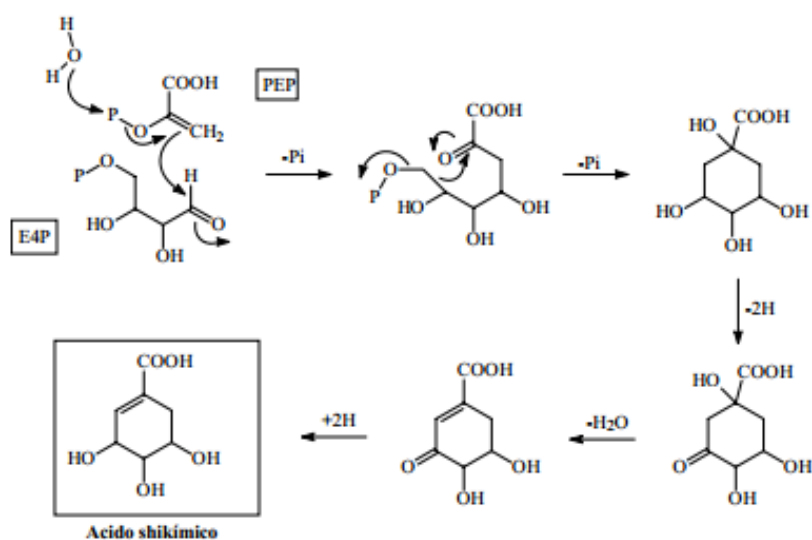


Figura 1.3 Biosíntesis del ácido shikímico [21]

En un resumen breve podemos decir que el eugenol es un derivado de la ruta del ácido shikímico, partiendo de la fenilalanina, luego pasando por el ácido cinámico para llegar al eugenol, todo esto por medio de muchas reacciones de biosíntesis, por las que se pasó por el ácido cafeíco y el ácido ferúlico antes del eugenol. En la Figura 1.4 podemos apreciar un resumen del proceso en el que el eugenol se encuentra dentro del grupo de los fenoles simples [20].

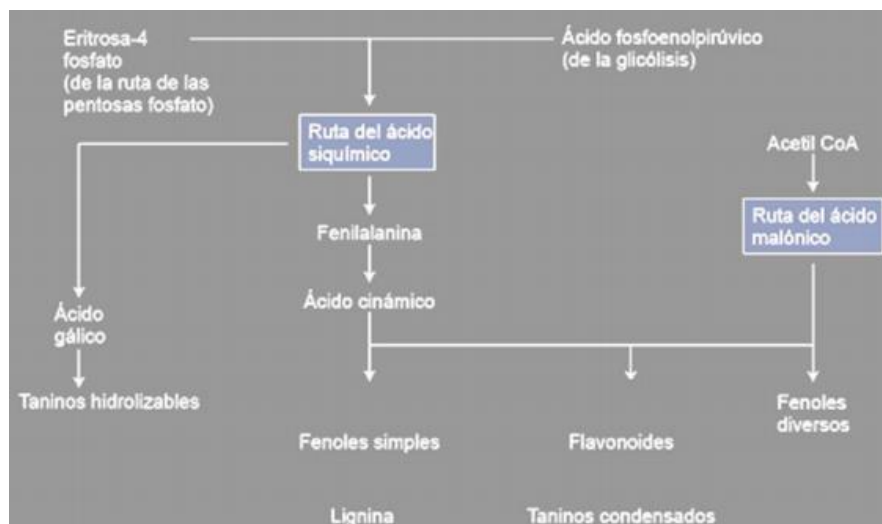


Figura 1.4 Breve resumen de la ruta del ácido shikímico [20]

1.4 EUGENOL

1.4.1 DESCRIPCIÓN

El eugenol es un compuesto orgánico derivado del fenol, pertenece al grupo de los fenilpropanoides; se lo extrae de plantas, principalmente del clavo de olor pero también se lo encuentra en pimienta, hojas de laurel, canela, albahaca, entre otras.

Es un líquido aceitoso de color amarillo muy tenue, su olor es característico y muy fácil de distinguir. En cuanto a la solubilidad es insoluble en agua y soluble en solventes orgánicos [22].

Dentro de las propiedades físicas y químicas del eugenol podemos mencionar [23]:

Punto de fusión:	- 9,2 °C
Punto de ebullición:	252 °C
Punto de inflamación:	> 110 °C
Densidad:	1,07 g/cm ³ (20 °C)

1.4.2 USOS: VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL EUGENOL

Su uso es muy amplio, en odontología se lo utiliza desde hace más de cien años, actualmente su principal aplicación en este campo es la elaboración de una pasta junto al óxido de zinc, esta mezcla sirve de relleno en conductos dentales, se produce una acción doble en este proceso, primero la acción analgésica del eugenol sobre los tejidos blandos y segundo que la pasta formada por el óxido de zinc y el eugenol forman un cemento que sella el conducto, este procedimiento es temporal hasta que se pueda realizar el proceso final con el material definitivo en la pieza dental, según lo descrito en las técnicas de estomatología [24].

La acción analgésica está dada porque el eugenol inhibe la acción de la ciclooxigenasa, en concentraciones bajas este efecto es reversible, mientras que en altas concentraciones tiene la desventaja de ser irreversible, produciéndose un bloqueo de la conducción nerviosa lo que lleva al eugenol a ser un neurotóxico [22].

En cuanto a la toxicidad de este fenilpropanoide, la DL₅₀ en ratas indica 1,930 mg/kg por ingestión, por lo que se debe tener cuidado en su uso en odontología, porque al usarlo

como parte del material sellante temporal en conductos dentales, el eugenol por acción de la saliva se libera y es ingerido por el paciente, existen estudios que sugieren que existen efectos citotóxicos con relación al material de relleno en conductos dentales dependiendo con el tipo de células con las que esté en contacto [25].

1.5 QUÍMICA COMPUTACIONAL

1.5.1 INTRODUCCIÓN A LA QUÍMICA COMPUTACIONAL

La química computacional pertenece al campo de la química teórica, fundamentalmente consiste en el modelaje de propiedades fisicoquímicas por medio de un software computacional, con la finalidad de predecir el comportamiento molecular, lo que se convierte en una guía importantísima para la química experimental y de esta manera se puede utilizar con mayor efectividad los recursos económicos y tiempo en una investigación.

El trabajo en química computacional está basado en la química cuántica, la que a su vez se explica por medio de la mecánica cuántica. Esto se debe a que toda la información para un modelaje de un sistema microscópico, como lo es el estudio atómico y de partículas subatómicas, está basado en el carácter estadístico, estudia el movimiento de macropartículas, tanto atómicas como subatómicas, y estos movimientos pueden ser utilizados para calcular propiedades fisicoquímicas de los átomos o moléculas [26].

Tal es la importancia de la química computacional que los científicos John Pople y Walter Kohn recibieron el Premio Nobel de Química, en 1998, por su contribución al desarrollo de las técnicas computacionales para explicar la estructura y actividad molecular [27].

Y aún mas reciente podemos mencionar a los investigadores: el austríaco Martin Karplus (Universidad de Strasburgo/Harvard), el sudafricano Michael Levitt (Standford) y el israelí Arieh Warshel (Universidad de Southern California) ganadores del premio Nobel de Química en 2013 por desarrollar modelos multiescala de sistemas químicos complejos, todo esto como aplicación de la química computacional.

1.5.2 MÉTODOS COMPUTACIONALES [28]

Existe una gran cantidad de métodos matemáticos que se pueden usar en química computacional, pero se los puede agrupar en dos categorías.

El primer grupo de métodos son los de la mecánica molecular, estos aplican las leyes de la física clásica al núcleo molecular sin consideración de los electrones.

Un segundo grupo está dado por la mecánica cuántica, la misma que se basa en la ecuación de Schrödinger, la que nos permite por medio de la estructura electrónica describir una molécula, subdividiéndose a su vez este grupo en métodos semiempíricos y Ab Initio. En la Figura 1.5 se representa la división antes mencionada.

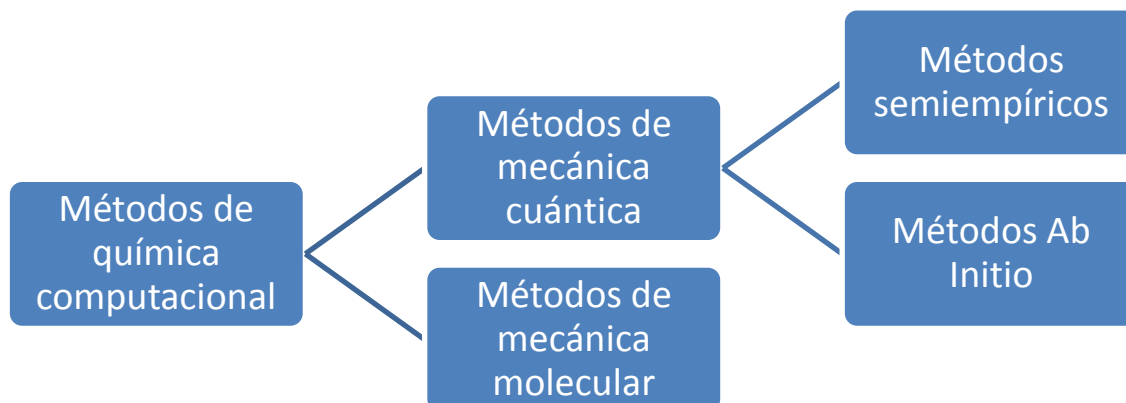


Figura 1.5 División de los métodos computacionales

1.5.3 APROXIMACIONES

Para poder utilizar la mecánica cuántica en la práctica, se deben realizar aproximaciones a la ecuación multinuclear, multielectrón Schrödinger, estas aproximaciones son tres:

- De Born Oppenheimer: asume que el núcleo es estacionario, debido a que los electrones se mueven mucho más rápido que el núcleo
- Hartree-Fock: asume que los electrones tienen un movimiento independiente el uno del otro.
- De Combinación lineal de orbitales atómicos, cuyas siglas en inglés son LCAO: espera que la solución de un electrón en una molécula de varios electrones será similar a la función de onda del electrón del átomo de hidrógeno [29].

1.5.4 MÉTODO AB INITIO

Este método tiene que ver con cálculos computacionales que se derivan directamente de principios teóricos sin tomar en consideración datos experimentales. Representa el cálculo aproximado de la ecuación cuanto mecánica [30].

El método ab initio puede predecir geometría molecular, momentos dipolares, energía de reacción, frecuencias vibracionales, espectros IR, espectros RMN, entre otros. El cálculo más común con este método es Hartree-Fock, que es una técnica de aproximación a un solo electrón usado en sistemas multielectrón. Al tratarse de una aproximación las energías obtenidas por este método siempre son mayores que las reales [30].

1.5.5 TEORÍA DEL FUNCIONAL DE LA DENSIDAD

La teoría del funcional de la densidad, cuyas siglas en inglés son DFT, divide la energía electrónica en diferentes componentes: energía cinética, interacción electrón-núcleo, repulsión de Coulomb e interacción electrón-electrón. Este método se base en que la energía de una molécula puede ser calculada por la densidad de un electrón y no por una función de onda[30].

El funcional híbrido más usado en DFT es B3LYP, debido a la gran precisión que presenta en los resultados obtenidos principalmente en moléculas orgánicas dependiendo de la función de base con la que se lo utilice [30].

1.5.6 FUNCIONES DE BASE

Las bases son una descripción matemática de los orbitales de un sistema que se utiliza para realizar cálculos teóricos y modelaciones [31]. A medida que el tamaño de las bases aumenta, también lo hace el trabajo computacional de un cálculo, lo que hace que una base grande sea más lenta para la obtención de resultados, pero en términos de precisión es una herramienta más potente.

1.5.7 OPTIMIZACIÓN GEOMÉTRICA

La optimización geométrica consiste en la variación sistemática de las coordenadas atómicas de una molécula, con el fin de encontrar una geometría en la cual las fuerzas netas en la estructura son igual a cero [32].

1.5.8 FRECUENCIAS VIBRACIONALES

El cálculo de las frecuencias vibracionales depende de la segunda derivada de la energía con respecto a la posición nuclear. De esta manera se pueden predecir espectros IR y Raman de una molécula en estado basal o de un estado de transición [32].

1.5.9 APLICACIONES DE QUÍMICA COMPUTACIONAL

La química computacional tiene una amplia aplicación en varios campos de la ciencia, tales como: química orgánica e inorgánica, espectroscopía, bioquímica, física, estudio de materiales, cinética química, biología, catálisis entre otra [26].

El uso de los recursos computacionales es muy variado pero podemos citar [33, 34]:

- Representación gráfica de átomos y moléculas
- Simulación de condiciones de una reacción
- Calculo de propiedades fisicoquímicas
- Interpretación de resultados obtenidos experimentalmente
- Predicción de propiedades en base a modificaciones de composición

CAPÍTULO II

2. MÉTODOS Y MATERIALES

2.1 PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

2.1.1 TOMA DE MUESTRA

La primera característica de la muestra es que sea representativa y homogénea, por ello se debe cuidar que todas las muestras sean tomadas en las mismas condiciones y que no tengan sesgo alguno por parte de quien realiza el muestreo.

En el caso de las muestras de este estudio, se tomó en consideración el estado en el que se consumen los dos tipos de albahaca, es decir el estado en el que se vende en los mercados y los compradores la utilizan con distintos fines, sin ningún tratamiento físico o químico previo.

- Muestras: las muestras tomadas fueron de las variedades de albahaca *Ocimum basilicum* o albahaca de sal y de *Ocimum americanum* o albahaca de dulce.
- Toma de muestra: las muestras fueron tomadas al azar procediendo al análisis inmediato de las mismas luego de colectadas, teniendo en consideración el procesamiento de muestras dentro de las siguientes 24 horas de su recolección.
- Lugar: en los mercados de Quito: Santa Clara e Ñaquito.

- Número de muestras analizadas: cinco muestras de cada tipo de albahaca para la extracción por tres métodos diferentes con su correspondiente duplicado, lo que indica un total de 30 determinaciones para albahaca de sal y 30 para albahaca de dulce.
- Preparación de las muestras: de las muestras colectadas solo se utilizó las hojas y flores presentes, por lo que se las separó del resto de la planta antes de iniciar las extracciones.

2.1.2 TÉCNICAS ANALÍTICAS

En el presente estudio se utilizaron varias técnicas analíticas, estas se dividen en dos fases: La primera fue la extracción del aceite esencial de las hojas y flores de la albahaca, tanto la de sal como la de dulce, para el posterior aislamiento del eugenol presente en dicho aceite.

La segunda fase del trabajo fue la caracterización de eugenol aislado de los dos tipos de albahaca, para lo que el uso de la espectroscopía de infrarrojos con transformadas de Fourier o FTIR y la espectroscopia de ultravioleta/visible o UV/VIS fueron necesarias, dichas técnicas fueron seleccionadas acorde a la disponibilidad de equipos y materiales.

2.1.2.1 EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL

Para la extracción del aceite esencial de las hojas y flores de los dos tipos de albahaca se utilizaron tres métodos: Destilación directa por Arrastre de vapor, Destilación por arrastre de vapor, método vapor vivo y extracción soxhlet.

a) DESTILACIÓN DIRECTA POR ARRASTRE DE VAPOR [19,35]

Cuando dos líquidos coexisten en un recipiente abierto a presión atmosférica, ambos contribuyen a la presión parcial sobre la superficie de los dos líquidos. Por ello cuando se aumenta la temperatura la presión de vapor sobre la superficie de los líquidos aumentará.

La ley de Dalton dice que la relación entre las presiones de vapor de dos líquidos es directamente proporcional a las concentraciones molares de ambas sustancias en fase gaseosa, lo que podemos expresar mediante la ecuación 2.1.

$$\left(\frac{P_A}{P_B}\right) = \left(\frac{M_A}{M_B}\right) \quad (2.1)$$

De esta manera al sumarse las dos presiones de vapor parciales, los dos líquidos pueden llegar al estado gaseoso con una temperatura menor a la que necesitarían las sustancias puras para hacerlo y así, en el caso del agua, arrastra o co-destila junto con una sustancia inmisible como el aceite esencial.

En el caso de la destilación por el método directo, el agua y el líquido que se desea arrastrar se encuentran en el mismo recipiente.

Para la extracción del aceite esencial por este método se realizó el siguiente procedimiento:

Se pesaron aproximadamente 40 g de muestra en un vaso de precipitación de 100 mL en la balanza analítica Mettler Toledo modelo AB204, luego se transfirió toda la muestra a un balón de base plana de 500 mL con boca esmerilada, se agregaron 250 mL de agua destilada y se sometió al calor en una plancha de calentamiento. Se acopló una trampa de Dean Stark sobre el balón y sobre esta trampa un condensador simple. Se dejó destilar por 45 minutos luego de caer la primera gota y se recolectó todo el líquido en un embudo de separación de 100 mL, para luego agregar alrededor de 1 g de cloruro de sodio y 50 mL de hexano, se desechó la porción acuosa y se guardó la fase orgánica que contiene el aceite esencial. El equipo utilizado se muestra en la Figura 2.1

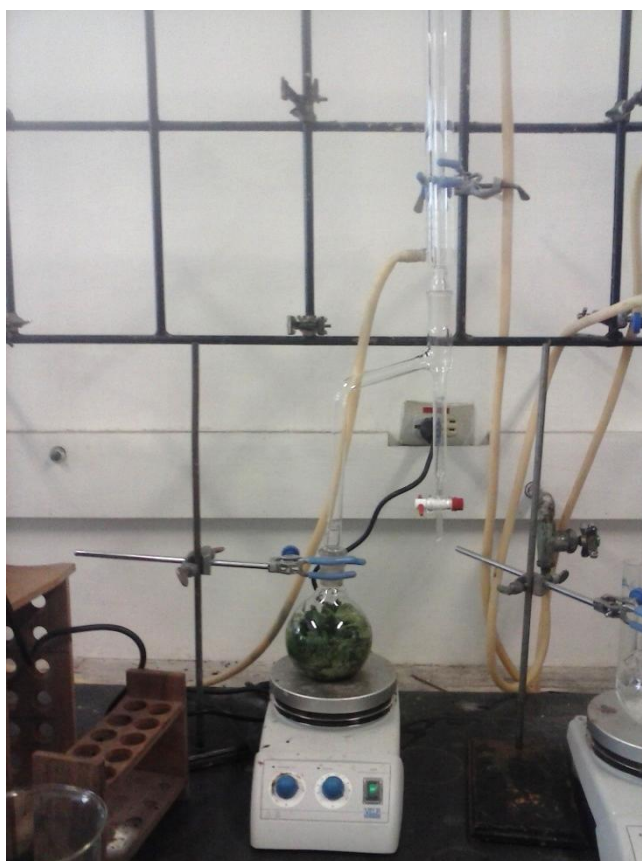


Figura 2.1 Equipo de destilación directa por arrastre de vapor

b) DESTILACIÓN POR ARRASTRE DE VAPOR , MÉTODO VAPOR VIVO [35]

A diferencia del método directo, en este caso el vapor del agua se genera en un recipiente diferente y luego pasa en forma de vapor de agua al recipiente donde se encuentra el material que contiene el líquido que se desea arrastrar con el vapor de agua. El principio por el cual se produce el arrastre o la co-destilación es el mismo que el método directo, es decir por la suma de las presiones parciales de cada líquido.

El procedimiento que se siguió en este caso fue el siguiente:

Se armó un equipo de destilación por arrastre de vapor, para el que se usó dos balones de base plana y boca esmerilada de 500 mL, 3 tapones de caucho perforados, tubos de vidrio, plancha de calentamiento, una manta de calentamiento y un refrigerante simple. El equipo se detalla en la Figura 2.2

Se pesaron aproximadamente 40 g de muestra en un vaso de precipitación de 100 mL en la balanza analítica Mettler Toledo modelo AB204, se transfirió toda la muestra al balón de base plana de 500 mL en el que se coloca la muestra, en el otro balón se colocaron 100 ml de agua destilada para generar el vapor vivo, luego de caer la primera gota se dejó destilar por 45 minutos, todo el líquido se colectó en un embudo de separación de 100 mL, para luego agregar alrededor de 1 g de cloruro de sodio y 50 ml de hexano, se desechó la porción acuosa y se guardó la fase orgánica que contiene el aceite esencial.



Figura 2.2 Equipo de destilación por arrastre de vapor, método vapor vivo

c) EXTRACCIÓN SOXHLET [36, 37]

Este método se utiliza cuando se desea extraer un componente de un sólido que lo contiene, mediante un solvente orgánico que lo arrastra. Tiene la característica de ser una extracción continua debido a que el solvente se calienta en un balón de destilación que está conectado a un extremo de la cámara de extracción, en el interior de esta se encuentra la muestra en un cartucho de celulosa o vidrio, por el otro lado de la cámara hay un refrigerante, el vapor del solvente que se calentó en el balón de destilación sube por un tubo lateral y se condensa al llegar al refrigerante cayendo sobre la muestra, la cámara se llena hasta alcanzar el nivel del sifón y el solvente regresa al balón junto con el material orgánico que arrastró, este proceso se repite cuantas veces sea necesario para la extracción del analito deseado.

Se armó el equipo de extracción soxhlet como se muestra en la figura 2.3, se pesaron 40 g de muestra en un vaso de precipitación de 100 mL, para luego ser transferidos al dedal de celulosa del extractor, al balón de destilación de 250 ml que se utilizó para el equipo se agregaron 130 mL de hexano, se dejó en reflujo hasta conseguir 8 ciclos, es decir que el equipo haya sifonado 8 veces. El contenido del balón luego del proceso se guardó directamente.

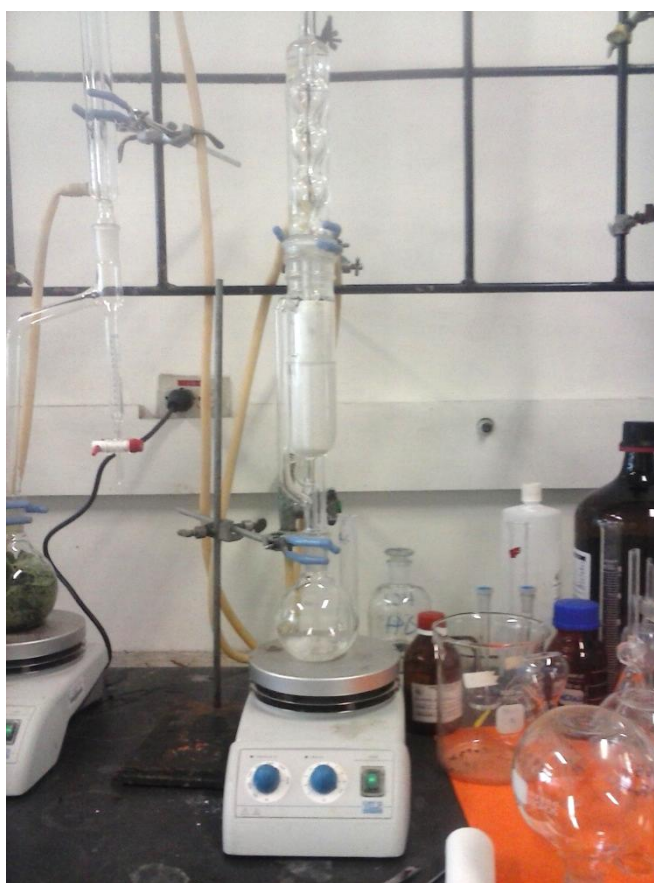


Figura 2.3 Equipo de extracción soxhlet

2.1.2.2 AISLAMIENTO DEL EUGENOL

a) REACCIONES ÁCIDO-BASE [38, 39, 40]

Existen una gran variedad de definiciones acerca de lo que son las reacciones ácido-base, por ejemplo: la de Arrhenius, la de Werner y Pfeiffer, la de Brönsted y Lowry, entre otras. En este estudio utilizaremos la propuesta por Lewis en 1938, donde se describe a un ácido como toda sustancia capaz de aceptar pares de electrones mientras una base es toda sustancia capaz de ceder pares de electrones. Es decir que para que una sustancia se comporte como un ácido es necesario que tenga al menos un centro ácido, y este centro, que será un átomo, debe cumplir las siguientes condiciones:

- Uno o más orbitales de baja energía vacíos.
- Carga positiva formal, relativamente elevada
- Número de coordinación incompleto

En el caso de una base, se debe entender que para comportarse como tal, debe tener al menos un centro básico, el mismo que cumple con:

- Que tenga electrones no compartidos con otros átomos.
- Que los electrones no compartidos estén fuertemente retenidos para que no sean transferidos y que solo puedan ser compartidos con el centro ácido.

Bajo estos conceptos la reacción entre un ácido y una base se conoce como reacción de neutralización y se define como: todo proceso en el que un ácido acepta uno o más pares

de electrones cedidos por una base para formar enlace covalente coordinado entre esta y dicho ácido.

b) PROCEDIMIENTO DE AISLAMIENTO DE EUGENOL [19]

Una vez que se obtuvo el aceite esencial por cualquiera de los tres métodos de extracción y lo mantuvimos en fase orgánica, se procedió al aislamiento del eugenol. Al embudo de separación que contiene el solvente con el aceite se agregaron 25 ml de NaOH al 5% , se recolectó la fase acuosa y a la orgánica se volvieron a agregar 25 mL de NaOH al 5% y se juntó con la fracción anterior, la fase del hexano se descartó. A continuación a la fracción colectada se agregaron 50 mL de HCl al 5%, comprobando luego que la solución haya tenido una característica ácida con la ayuda de un trozo de papel tornasol, previo al siguiente paso, el mismo que consistió en agregar 30 mL de hexano a la solución anterior, mediante la utilización de un embudo de separación se eliminó la fase acuosa y se conservó la orgánica, a la que se agregó sulfato de sodio anhidro y se dejó en reposo. Se transfirió la fase del hexano a un balón de destilación de 200 mL de boca esmerilada y se retiró el solvente con ayuda de un equipo de rotaevaporación, el mismo que tiene un baño térmico marca Yamato modelo BM200, control de rotación marca Yamato, modelo RE200, se dejó rotaevaporar aproximadamente 10 minutos a una temperatura de 35 °C en el baño, a presión reducida. Se secaron por fuera los balones y se dejaron dentro de un desecador plástico, para posteriormente ser pesados.

2.1.2.3 CARACTERIZACIÓN INSTRUMENTAL DE EUGENOL

a) INSTRUMENTACIÓN [41, 42, 43]

El instrumento utilizado para los análisis tanto en la región UV/Vis y IR es el espectrofotómetro, mismo que tiene un principio básico que no cambia y lo que va evolucionando con el pasar del tiempo son el tipo de componentes que permiten obtener una mejor sensibilidad del equipo y una mayor facilidad en su uso.

Tanto los espectrofotómetros UV/Vis como los IR tienen una distribución básica de sus componentes, que se detalla en el Diagrama 2.1.



Diagrama 2.1 Componentes básicos de un espectrofotómetro

Para el espectrofotómetro UV/Vis debemos precisar que la fuente de radiación es una lámpara de arco de xenón, la misma que cubre las dos áreas del espectro electromagnético. Existen espectrofotómetros que solo funcionan en el UV o solo en el Visible, para los que la fuente de radiación es una lámpara de tungsteno en el caso de visible y una de deuterio para la región ultravioleta. Para la selección de la longitud de onda se utiliza un monocromador y el detector puede ser un fototubo multiplicador o un arreglo de diodos, cuya función es convertir la intensidad de luz que llega a ellos en una respuesta eléctrica.

Los espectrofotómetros de infrarrojos se dividen en dos grupos: los de dispersión y los de transformadas de Fourier, siendo la principal diferencia entre ellos, el selector de longitud de onda, para los primeros se utiliza un sistema de espejos que direccionan la luz a una rejilla de dispersión con la que se separan las diferentes longitudes de onda y se consigue el haz de luz monocromática. Para el segundo tipo de espectrofotómetros mencionados, la selección de la longitud de onda se la realiza por medio de un interferómetro de Michelson, la respuesta obtenida es un interferograma, pero por medio de un función matemática de transformadas de Fourier se puede convertir en un espectro de absorbancia o transmitancia versus número de onda.

Como detectores en este tipo de equipos podemos tener sensores térmicos, sensores piroeléctricos o sensores fotoconductores.

b) ESPECTROFOMETRÍA UV/VIS [41, 44, 45]

Cuando hablamos de la región Ultravioleta/Visible (UV/Vis), estamos situados en el espectro electromagnético entre 200 y 800 nm, pero esta zona esta subdividida a su vez en dos, la razón principal puede decirse que se debe a que el límite entre las dos es la capacidad del ojo humano para detectar la radiación electromagnética. Por ello la zona del Visible es aquella en la que nuestro ojo es sensible a la luz, entendiéndose esta por la radiación entre 400 y 800 nm, mientras que la zona del Ultravioleta va de 200 a 400 nm.

Como característica en común de las dos regiones, tenemos que los electrones absorbe energía y por ende se excitan a niveles de energía superiores.

La energía total que tiene una molécula puede expresarse como la suma de la energía electrónica, vibracional, rotacional y traslacional de dicha molécula. Lo que se puede expresar en la ecuación 2.2

$$\Delta E = \Delta E_{elec} + \Delta E_{rotac} + \Delta E_{vibrac} + \Delta E_{trasla} \quad (2.2)$$

Para la medición de estos cambios de energía en una molécula se utiliza un espectrofotómetro, este equipo hace un barrido entre las longitudes de onda de las zonas de UV y Visible y nos presenta los resultados de este barrido en forma de un gráfico llamado espectro, que fundamentalmente expresa la absorbancia o transmitancia de la energía a lo largo de todas las longitudes de onda previstas dentro del análisis.

La atenuación del rayo de luz se conoce como transmitancia, en este caso hablamos de un haz de luz monocromática, se expresa como la relación existente entre la porción de luz transmitida (I) y el rayo incidente (I_0), como se expresa en la ecuación 2.3 mientras que el porcentaje de transmitancia se expresa en la ecuación 2.4

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (2.3)$$

$$\%T = \frac{I}{I_0} \times 100 \quad (2.4)$$

En la caracterización UV/VIS se utilizó el espectrofotómetro UV/VIS marca Agilent Technologies, modelo CARY 60, que se encuentra en la Escuela de Ciencias Químicas de la Universidad Católica del Ecuador. Se obtuvieron los espectros de barrido del estándar de eugenol marca Aldrich, con referencia E51.791-100G y lote número MKBJ0904V.

Se utilizó el eugenol restante de todas las muestras, luego del análisis de infrarrojos, para realizar una única solución con hexano de las muestras de albahaca de sal y otra para las de albahaca de dulce, debido a la pequeña cantidad del compuesto obtenida, de esta manera se buscó obtener el espectro de barrido de cada tipo de albahaca para compararlo con el del estándar.

c) ESPECTROMETRÍA DE INFRARROJOS (IR) [41, 42]

Es una de las principales técnicas instrumentales para la identificación cualitativa de compuestos, teniendo una gran aplicación en todos los campos.

A diferencia de la región ultravioleta/visible, en el infrarrojo los espectros obtenidos son mucho más complejos, teniendo una gran cantidad de picos en las lecturas de un compuesto, esto a su vez es lo que le da la característica de ser un método de identificación por excelencia, debido a que cada compuesto tiene un espectro único, lo que permite identificar a sustancias desconocidas contrastándolas con los espectros de estándares o archivos de espectros de sustancias puras. Estos gráficos están expresado en base a la transmitancia o absorbancia versus el número de onda (el inverso de la longitud de onda y se expresa en cm^{-1}).

El rango del espectro electromagnético que ocupa esta región, va entre el visible y microondas, teniendo desde $0,75\ \mu\text{m}$ hasta $1000\ \mu\text{m}$ el área que ocupa el infrarrojo.

A su vez esta parte del espectro se subdivide en tres: el infrarrojo cercano ($0,75\ \mu\text{m} - 2,5\ \mu\text{m}$), el infrarrojo medio o fundamental ($2,5\ \mu\text{m} - 25\ \mu\text{m}$) y el infrarrojo lejano ($25\ \mu\text{m} - 1000\ \mu\text{m}$).

Existen dos tipos de vibraciones en un enlace entre dos átomos. Cuando se irradia luz monocromática y esta tiene la misma energía que el dipolo formado, se producen vibraciones de estiramiento o tensión y vibraciones de flexión o deformación. Estos movimientos moleculares se encuentran ilustrados en la Figura 2.4 que se muestra a continuación.

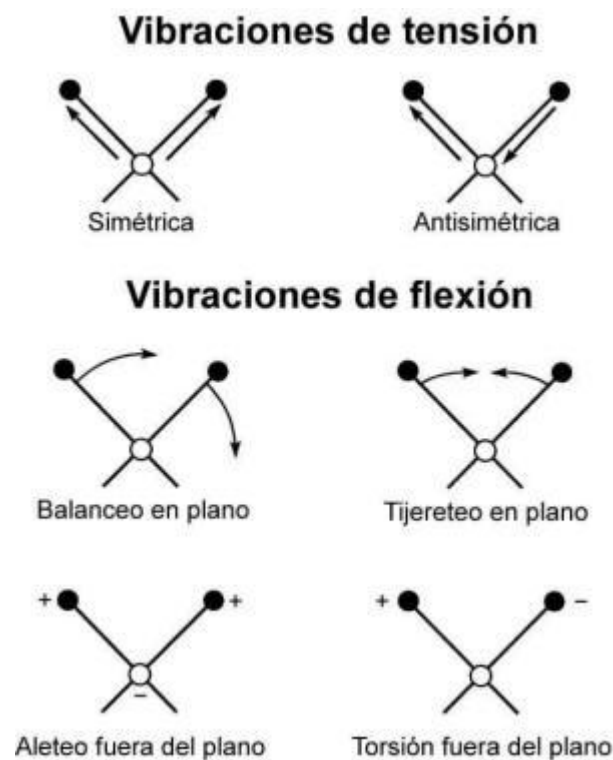


Figura 2.4 Vibraciones de tensión y flexión por acción de energía electromagnética [46]

En resumen, las vibraciones de estiramiento o tensión tienen que ver con la variación en la longitud del enlace entre dos átomos y se produce en el mismo plano. Las vibraciones de flexión o deformación producen un cambio de posición en el plano y el ángulo formado varía como consecuencia lógica de dicho movimiento.

- **ATR**

El ATR (Attenuated Total Reflection) es una técnica de muestreo utilizada en aplicaciones IR, la cual se produce cuando una radiación infrarroja entra en un cristal ATR transmisor y de alto índice de refracción. El cristal está diseñado para permitir una reflexión interna total que crea una onda evanescente sobre la superficie del cristal. Esta onda se extiende a la muestra que se mantiene en contacto íntimo con el cristal, registrándose el espectro de infrarrojo del analito.

El procedimiento seguido para el estudio espectroscópico de infrarrojos fue el siguiente:

Luego de que el eugenol extraído fue pesado en la balanza analítica Mettler Toledo modelo AB204, se realizó la caracterización IR del compuesto, para lo que se utilizó el espectrofotómetro de infrarrojos con transformadas de Fourier marca Perkin Elmer modelo Spectrum BX, ubicado en la escuela de Ciencias Químicas de la Universidad Católica del Ecuador. Primero se recolectó el eugenol, disperso en forma de pequeñas gotas por todo el fondo del balón, con la ayuda de un hisopo de algodón, el mismo que se utilizó para colocar la muestra sobre el acople Miracle del espectrofotómetro para realizar la lectura, y de esta manera obtener el espectro infrarrojo para cada una de las muestras y duplicados, así como el correspondiente espectro del estándar de eugenol marca Aldrich, cuyo

certificado de análisis se encuentra en el Anexo 2, con el que se comparó los resultados obtenidos para cada muestra. Los espectros se obtuvieron en digital con la utilización del software Spectrum 5.0.1 en la modalidad Spectrum BX FT-IR. Primero se corrió una línea base, para posteriormente hacer la corrección respectiva de línea base a todos los espectros.

- **INTERPRETACIÓN DE ESPECTROS IR [47, 48]**

Es fundamental tener en consideración que por la gran cantidad de picos que podemos obtener en un espectro de infrarrojos, es necesario analizar su intensidad, posición y forma. Para ello es necesario tener en consideración las regiones en las que aparecen ciertos picos que pertenecen a un grupo funcional específico, para lo que se debe utilizar una tabla como la que se muestra en el Anexo 1, con ello podemos empezar a identificar un compuesto.

La parte principal de la identificación tiene que ver con la zona de huella digital en un espectro, que va entre 1400 cm^{-1} y 600 cm^{-1} , puesto en esta área del espectro encontramos los picos característicos de cada compuesto. Para finalizar el análisis es necesario contrastar el espectro de la muestra con el del estándar correspondiente, para garantizar la identificación del analito en cuestión.

d) ANÁLISIS COMPUTACIONAL

En cuanto a la parte computacional, se graficaron las estructuras moleculares como primera parte y posterior a esto se realizó la optimización de la molécula de eugenol. Para

este estudio se utilizó el software Gauss View 4.1.2. para graficar la estructura, y el programa Gaussian 03 para realizar los cálculos de optimización, frecuencia (espectro IR) y obtención de espectro UV/VIS. Para estos cálculos se utilizó el método de cálculo B3LYP, luego de comprobar que se obtenía información mucho más cercana que con el método Hartree-Fock. La base utilizada para el cálculo fue 6-311g, luego de haber probado con bases más sencillas o complejas.

La optimización de la molécula se realizó utilizando el keyword OPT que nos permite obtener la estructura probabilísticamente más estable, y sobre esta estructura realizar el cálculo para buscar los diferentes espectros. Para la obtención de los espectros IR el keyword utilizado fue FREQ, mientras que para el espectro UV/Vis fue CIS.

2.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

2.2.1 TRATAMIENTO DE RESULTADOS

Se utilizó el peso inicial de la muestra, siendo este para todos los casos alrededor de 40 g y el peso final del eugenol luego de obtenido por cualquiera de los tres métodos de extracción y finalmente ser aislado, todo esto para poder obtener el porcentaje de eugenol que obtuvimos luego del análisis de cada muestra y comparar ese porcentaje entre los métodos y entre los dos tipos de albahaca.

2.2.2 ANÁLISIS DE VARIANZAS (ANOVA) [49,50]

El análisis de las varianzas es una gran herramienta en la estadística para la comparación de tres o más métodos y saber si existen diferencias significativas entre ellos. Lo que en nuestro caso de estudio es necesario ya que comparamos el rendimiento de cada método de extracción para la obtención de eugenol, teniendo tres métodos por cada tipo de albahaca.

Partimos de plantear dos hipótesis, la hipótesis nula en este caso es, no existen diferencias significativas entre los métodos de extracción y la hipótesis alterna por el contrario dice que existen diferencias significativas entre los métodos de extracción.

El estadístico F que se utiliza en para el análisis de ANOVA está dado por la siguiente expresión 2.5:

$$F = \frac{CMG}{CME} \quad (2.5)$$

donde CMG o CMTR es el cuadrado medio de los grupos o tratamientos y CME el cuadrado medio del error.

Para poder llegar al cálculo de la expresión 2.5, se necesitan varias operaciones previas, en la Tabla 2.1 se muestra un resumen de dichas operaciones.

Tabla 2.1 Resumen de operaciones para ANOVA [51]

Fuente de variación	g. l.	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Estadístico de prueba (F)
Intermuestral (Tratamiento)	$v_1 = k-1$	SCTR	$CMTR = SCTR / v_1$	F=CMTR/CME
Intramuestral (Error)	$v_2 = \sum n_i - k$	SCE	$CME = SCE / v_2$	
Total	$n-1$	SCT		

$$SCTR = \sum n_i (\bar{x}_i - \bar{\bar{x}})^2 ;$$

$$SCT = \sum \sum (x_{ij} - \bar{\bar{x}})^2 ;$$

$$SCE = SCT - SCTR$$

donde :

SCTR es la suma de cuadrados de los tratamientos, SCE es la suma de los cuadrados del error, SCT es la suma total de los cuadrados, CMTR es los cuadrados medios de los tratamientos y CME los cuadrados medios del error.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 MUESTREO

Los dos tipos de albahaca utilizados en este trabajo fueron obtenidos en los mercados de Quito, principalmente en los de Santa Clara e Iñaquito, comprando los atados de albahaca los días martes y viernes debido a que eran los días en los que se podían encontrar más frescas, en especial la albahaca de dulce

La diferencia entre albahaca de sal (*Ocimum basilicum*) y albahaca de dulce (*Ocimum americanum*) no solo tiene que ver desde la parte física de las plantas, que de por sí tienen diferencia entre sus hojas por tamaño y grosor, por su coloración la variedad de sal es verde intenso y la variedad dulce tiene tonalidades de violeta principalmente en el tallo. La diferencia de composición en el aceite esencial es fundamental por ello el aroma característico de cada una de ellas y esto se ve reflejado en la variación existente en el contenido de eugenol en los dos tipos.

3.2 TRATAMIENTO DE MUESTRAS

Se utilizó la muestra fresca, debido a dos factores principales, el primero de ellos fue que el objetivo del estudio tiene que ver con el estado en el cual se expende y consume la albahaca para los distintos usos y en esas condiciones aislar el eugenol de los dos tipos de *Ocimum*, adicional a esto se realizaron pruebas preliminares con muestras de albahaca seca, obteniéndose resultados muy poco alentadores, principalmente por la baja cantidad de eugenol que se pudo aislar. En diferente bibliografía se ha podido encontrar que usualmente se utiliza las muestras frescas pero también en otros libros se expresa que el uso de muestra seca es más eficaz, por lo que las pruebas preliminares fueron necesarias para determinar que en el caso de la albahaca de sal así como en la de dulce los mejores resultados fueron obtenidos al trabajar con muestra fresca. Para hojas de eucalipto, laurel, menta se utiliza por ejemplo las hojas frescas para la extracción de aceite esencial [36].

Con las dos albahacas se probaron distintas formas de colocar la muestra para las extracciones, se disminuyó el tamaño de las hojas e inflorescencias, cortándolas hasta un tamaño de alrededor de 1 cm^2 , con este tratamiento se obtuvo mucha dificultad a la hora de pesar la cantidad de albahaca para los análisis, debido a que los cortes aumentaban la superficie por la cual los compuestos volátiles y humedad presentes en las muestras se desprendían. Luego de probar varias opciones se utilizó las hojas e inflorescencias completas, lo que permitía una mayor facilidad para pesar las muestras y adicionalmente se obtenía un mayor porcentaje de eugenol luego de la extracción y aislamiento.

En el caso de la albahaca de dulce (*Ocimum americanum*) fue necesario realizar con prontitud las extracciones puesto que en comparación con la albahaca de sal, este tipo de *Ocimum* se marchita con facilidad y mucho más rápido por lo que el estudio de esta especie se lo realizó con las precauciones necesarias para evitar alterar los resultados debido a que la muestra ya no sea representativa.

3.3 EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL

El proceso de extracción del aceite esencial se lo realizó por tres métodos distintos, de los cuales dos de ellos eran de carácter acuoso, destilación directa por arrastre de vapor y destilación por arrastre de vapor vivo, la extracción soxhlet se la realizó con hexano, como solvente orgánico.

Los métodos de extracción funcionaron muy bien para la albahaca, pero es importante destacar que el extracción soxhlet permitió una mayor cantidad aceite esencial en los dos tipos de albahaca. Esto muestra que es el método con mejor rendimiento, pero su utilización a gran escala demandaría gran cantidad de solvente orgánico, lo que implica un costo mayor por la adquisición del solvente y luego para la disposición final de los desechos de dicho solvente, lo que sin duda lo vuelve una opción inviable a gran escala.

Esto se puede contrastar con un estudio realizado en Perú, sobre la obtención de aceite esencial en una planta llamada palo de rosa, en el cual se compara la cantidad de aceite que se puede extraer mediante destilación por arrastre de vapor, extracción con fluidos supercríticos y extracción con solvente (n-hexano) y en este estudio se obtuvo una mayor

cantidad de aceite esencial en la extracción con solventes, lo que nos permite decir que este trabajo guarda total coherencia con lo obtenido en otras investigaciones [52].

Entre los métodos acuosos de extracción se concluye que no existe una mayor diferencia, debido a que en ambos casos el mecanismo por el que el aceite esencial es arrastrado es el mismo, con la diferencia que en la destilación directa el vapor que arrastra se produce en el mismo balón, mientras que el arrastre por vapor vivo genera dicho vapor en otro balón sin haber estado en contacto con anterioridad con la muestra, lo que no genera mayor diferencia ya que el analito buscado no se solubiliza en el agua y no se corre riesgo de que tengamos disminución en el rendimiento a causa de este factor.

El aceite esencial obtenido era incoloro o ligeramente amarillo, con un olor muy agradable, típico de albahaca, aproximadamente unos 0,275 g por 40g de muestra, es decir un 0,11% de aceite esencial en promedio. El valor promedio de aceite esencial está dentro del rango que se encuentra en la bibliografía que dice que el porcentaje de aceite esencial está entre el 0,04% y el 0,7% para *Ocimum basilicum* [53].

En la Tabla 3.1 podemos encontrar los pesos promedio de aceite esencial para cada tipo de extracción en las dos albahacas del presente estudio.

Tabla 3.1 Pesos promedio de aceite esencial para cada tipo de extracción

	Peso de Aceite esencial albahaca de sal (g)	Peso de Aceite esencial albahaca de dulce (g)
Arrastre de vapor	0,293	0,277
Destilación directa	0,240	0,234
Soxhlet	0,306	0,299

3.4. AISLAMIENTO DE EUGENOL

Para el proceso de aislamiento del eugenol se utilizó el método descrito para la obtención de este compuesto en aceite esencial de clavo de olor [19]. En este método se aprovecha la estructura de la molécula de nuestro compuesto en estudio, puesto que al ser un derivado fenólico tiene la capacidad de actuar como un ácido frente a una base, en este caso se utilizó el hidróxido de sodio al 5%, formando de esta manera una sal soluble en agua, mientras el resto de compuestos presentes en el aceite esencial, que no tienen esta característica, se quedan en la fase orgánica. Se colectó la fase acuosa que contiene la sal de sodio y eugenol y se adicionó ácido clorhídrico al 5% para poder restituir el eugenol que es muy poco soluble en agua y con 30 mL de hexano se aisló el eugenol de la fase acuosa que contiene cloruro de sodio.

Una vez que se obtuvo el eugenol en la fase orgánica se realizó rotaevaporación para poder dejar libre en el balón únicamente nuestro analito y recuperar el solvente.

Como resultado de este proceso se obtuvieron pequeñas gotas en el fondo del balón, incoloras, de apariencia aceitosa y con el característico olor del eugenol

Se calculó el rendimiento de los métodos de extracción en base a la cantidad final de eugenol que se obtuvo, debido a que el proceso de aislamiento es el mismo, la diferencia viene dada por los métodos de extracción.

Para la albahaca de sal se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 3.2 por el método de destilación directa por arrastre de vapor con una media de 0,021 % de eugenol en 40 g de muestra.

Tabla 3.2 Rendimiento de eugenol obtenido por destilación directa por arrastre de vapor en albahaca de sal (*Ocimum basilicum*)

Muestra	Duplicado	Peso de la muestra (g)	Peso del eugenol (g)	Porcentaje de rendimiento (%)
1		40,0783	0,0092	0,023
	1	40,0816	0,0073	0,018
2		40,6057	0,0101	0,025
	2	40,1837	0,0092	0,023
3		40,1683	0,0082	0,020
	3	40,1155	0,0087	0,022
4		40,2843	0,0077	0,019
	4	40,1564	0,0083	0,021
5		40,0076	0,0081	0,020
	5	40,3174	0,0091	0,023
			Media	0,021
			Desviación estándar	0,002

En la Tabla 3.2 podemos observar los resultados de las muestras así como de sus duplicados, tanto en peso de eugenol como en porcentaje en relación con el peso inicial de la albahaca.

Con la ayuda de la tabla de distribución t, que se muestra en el Anexo 3, podemos encontrar los límites de confianza, con un error del 5%, para nuestras determinaciones y en base a la media y desviación estándar, saber que tan precisos son los resultados. Mediante la ecuación 3.1 podemos encontrar los límites de confianza para un valor de t determinado.

$$t = \frac{x - \mu}{\frac{\sigma}{\sqrt{n}}} \quad (3.1)$$

Donde tenemos que t es el valor tabulado que podemos encontrar en el Anexo 3 tomando en consideración el grado de confianza que deseamos y el número de grados de libertad que están dados por n-1.

μ es la media de las determinaciones experimentales

σ es la desviación estándar

n el número de repeticiones

x el valor particular en el que t toma el valor tabulado

Para determinar los límites de confianza debemos encontrar los valores de $\pm x$ para los que el valor de t se cumple, es importante saber que vamos a encontrar un valor de x que va a estar por encima de la media y por debajo de ella, lo que nos da los límites de confianza que necesitamos hacia los dos lados de la media experimental.

En este estudio se eligió la media como el valor de referencia para determinar la precisión de los valores obtenidos debido a que en la bibliografía no se puede encontrar un valor exacto de eugenol presente en la albahaca, sino por el contrario se encuentra un rango amplio que impide realizar el análisis de precisión con esos datos.

Para este caso nuestros valores al 95% de confianza deberían estar entre 0,020 y 0,022 para expresar que es un resultado preciso, pero en este caso de la Tabla 3.2, cuatro de las 10 determinaciones están en el rango y las otras seis fuera, lo que nos deja saber que las mediciones son aleatorias, existen valores por encima y debajo de la media, fenómeno propio de un estudio experimental.

Adicional a esto podemos decir que los límites de confianza al 90% son los mismo, esto debido a que los valores son pequeños y la desviación estándar también lo es, lo que impide que el rango sea más amplio y por eso en su mayoría los valores de esta determinación queden por fuera.

En cuanto a la destilación por arrastre de vapor vivo, los datos obtenidos se muestran en la Tabla 3.3 con una media de 0,038 % de eugenol en 40 g de muestra.

Tabla 3.3 Rendimiento de eugenol obtenido por destilación por arrastre de vapor método vapor vivo en albahaca de sal (*Ocimum basilicum*)

Muestra	Duplicado	Peso de la muestra (g)	Peso del eugenol (g)	Porcentaje de rendimiento (%)
1		40,0369	0,0146	0,036
	1	40,1409	0,0152	0,038
2		40,1888	0,0156	0,039
	2	40,5076	0,0168	0,041
3		40,0985	0,0154	0,038
	3	40,1107	0,0147	0,037
4		40,3301	0,0153	0,038
	4	40,427	0,0149	0,037
5		40,1733	0,0157	0,039
	5	40,2512	0,0147	0,037
Media				0,038
Desviación estándar				0,001

En la Tabla 3.3, podemos observar que para los límites de confianza 0,037 y 0,039 con un error del 5% existen 8 valores que están incluidos en dicho intervalo, lo que nos indica una mayor presión en estas determinaciones.

El método de extracción soxhlet y su rendimiento para albahaca de sal se muestran en la Tabla 3.4 con una media de 0,042 % de eugenol en 40 g de muestra.

Tabla 3.4 Rendimiento de eugenol obtenido por extracción soxhlet en albahaca de sal (*Ocimum basilicum*)

Muestra	Duplicado	Peso de la muestra (g)	Peso del eugenol (g)	Porcentaje de rendimiento (%)
1		40,0853	0,0178	0,044
	1	40,3172	0,0161	0,040
2		40,0173	0,0171	0,043
	2	40,2915	0,0181	0,045
3		40,1137	0,0166	0,041
	3	40,1328	0,0164	0,041
4		40,1845	0,0172	0,043
	4	40,0576	0,0168	0,042
5		40,2311	0,0173	0,043
	5	40,1836	0,0169	0,042
			Media	0,042
			Desviación estándar	0,002

En este caso, al 95% de confianza tenemos el intervalo entre 0,041 y 0,043, donde nuevamente tenemos 8 valores que están incluidos en el intervalo.

La precisión de las determinaciones es muy buena, a pesar de que los valores son pequeños.

Para la albahaca de dulce (*Ocimum americanun*) se obtuvieron rendimientos menores en todos los métodos, debido a un menor contenido de eugenol en esta especie de albahaca. En la tabla 3.5 se muestran los resultados obtenidos mediante destilación directa por arrastre de vapor, mientras en la tabla 3.6 se detalla lo propio para la destilación por arrastre de vapor vivo y finalmente en la tabla 3.7 podemos encontrar lo referente a la extracción soxhlet de la *Ocimum americanum*.

Tabla 3.5 Rendimiento de eugenol obtenido por destilación directa por arrastre de vapor en albahaca de dulce (*Ocimum americanum*)

Muestra	Duplicado	Peso de la muestra (g)	Peso del eugenol (g)	Porcentaje de rendimiento (%)
1		40,3047	0,0083	0,021
	1	40,3578	0,0078	0,019
2		40,5221	0,0086	0,021
	2	40,0554	0,0072	0,018
3		40,2331	0,0087	0,022
	3	40,4179	0,0075	0,019
4		40,0034	0,0088	0,022
	4	40,1760	0,0076	0,019
5		40,1826	0,0083	0,021
	5	40,1944	0,0079	0,020
			Media	0,020
			Desviación estándar	0,001

Para la extracción por destilación directa de albahaca de dulce con una confianza del 95% tenemos un intervalo entre 0,019 y 0,021.

Tabla 3.6 Rendimiento de eugenol obtenido por destilación por arrastre de vapor método vapor vivo en albahaca de dulce (*Ocimum americanum*)

Muestra	Duplicado	Peso de la muestra (g)	Peso del eugenol (g)	Porcentaje de rendimiento (%)
1		40,1821	0,0135	0,034
	1	40,4361	0,0143	0,035
2		40,1006	0,0139	0,035
	2	40,0442	0,0129	0,032
3		40,2263	0,0132	0,033
	3	40,3328	0,0137	0,034
4		40,0106	0,0117	0,029
	4	40,1554	0,0136	0,034
5		40,3541	0,013	0,032
	5	40,1212	0,0136	0,034
Media				0,033
Desviación estándar				0,002

El intervalo de confianza para la extracción por arrastre de vapor esta dado entre 0,032 y 0,034, lo que nos deja ver que siete valores de la determinación son precisos con un error del 5%.

Tabla 3.7 Rendimiento de eugenol obtenido por extracción soxhlet en albahaca de dulce (*Ocimum americanum*)

Muestra	Duplicado	Peso de la muestra (g)	Peso del eugenol (g)	Porcentaje de rendimiento (%)
1		40,2486	0,0159	0,040
	1	40,4765	0,0163	0,040
2		40,3813	0,0162	0,040
	2	40,0344	0,0157	0,039
3		40,4239	0,0152	0,038
	3	40,2601	0,0155	0,038
4		40,1174	0,0166	0,041
	4	40,0215	0,016	0,040
5		40,1141	0,0163	0,041
	5	40,0621	0,0161	0,040
Media				0,040
Desviación estándar				0,001

Tenemos un intervalo entre 0,039 y 0,041 con un error del 5% en el cual se aprecia que ocho de los diez valores de la extracción son precisos y que los otros dos valores están muy cercanos a el intervalo de confianza.

Los valores de desviación estándar son muy pequeños y similares tanto en las muestras como en los métodos

Para determinar si existen diferencias significativas entre los métodos de extracción aplicados a un mismo tipo de albahaca, se utilizó el análisis de varianzas (ANOVA) ya que con este método estadístico podemos comparar dos o más grupos de datos. El valor de F utilizado para dicho análisis estadístico tiene un error del 5%. En la Tabla 3.8 podemos ver un resumen del ANOVA realizado para los métodos de extracción de albahaca de sal, en el que podemos apreciar que existen diferencias significativas entre los métodos, lo que nos indica que las diferencias no tienen relación con errores aleatorios sino con el método en sí. Lo que nos lleva a rechazar la hipótesis nula que nos planteaba que no existen diferencias significativas entre los métodos de extracción. Similar situación ocurre con la albahaca de dulce, lo que se ve reflejado en la Tabla 3.9.

Tabla 3.8 Análisis de varianza de los tres métodos de extracción utilizados para la albahaca de sal (*Ocimum basilicum*)

ANÁLISIS DE VARIANZA					
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,00246342	2	0,00123171	421,144997	3,35413083
Dentro de los grupos	7,8966E-05	27	2,9247E-06		
Total	0,00254239	29			

En la Tabla 3.8 podemos apreciar que el valor de F calculado 421,1449 es mucho mayor al valor de F crítico, estos valores de F críticos están tabulados y los podemos encontrar en el Anexo 4, la principal información de esta Tabla, es que nuestra hipótesis nula no es verdadera, es decir existen diferencias significativas entre los tres métodos de extracción porque en el análisis de varianzas para que la hipótesis nula (no existen diferencias

significativas entre los tres métodos) sea verdadera el valor calculado de F debe ser menor al valor tabulado, lo que en este caso es opuesto, por ello decimos que los tres métodos tiene diferencias significativas, siendo esta la hipótesis alterna que es verdadera.

Tabla 3.9 Análisis de varianza de los tres métodos de extracción utilizados para la albahaca de dulce (*Ocimum americanum*)

ANÁLISIS DE VARIANZA					
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,0020099	2	0,00100495	505,533601	3,35413083
Dentro de los grupos	5,3673E-05	27	1,9879E-06		
Total	0,00206357	29			

Al igual que en la tabla anterior podemos apreciar que el valor de F calculada es mucho mayor al valor de F tabulada, por lo que la hipótesis nula que dice que no existen diferencias significativas entre los métodos, es falsa

Las diferencias entre los métodos están dadas por dos razones principales, la primera de ellas el uso de agua o hexano para la extracción, puntualmente en el caso entre la extracción soxhlet y las dos extracciones acuosas, el solvente orgánico permite arrastrar consigo una mayor cantidad de compuestos, no solo los presentes en el aceite esencial sino también pigmentos por mencionar alguno, lo que evidentemente aumenta la cantidad de extracto al final.

La segunda razón tiene que ver con las extracciones acuosas, la destilación por arrastre de vapor permite que el aceite esencial sea arrastrado con el vapor que se genera previamente y entra en contacto directamente con todo el material vegetal, mientras que en la destilación directa el vapor que arrastra se forma en el mismo recipiente en el que se contiene el agua y la albahaca, por esto existen diferencias significativas entre los métodos de extracción del aceite esencial.

3.5 CARACTERIZACIÓN DEL EUGENOL

Para la caracterización del eugenol se utilizó como técnica principal la espectrofotometría de infrarrojos, utilizando un estándar de eugenol para comparar su espectro con los obtenidos de las muestras, y de esta manera asegurar que los productos del aislamiento son efectivamente eugenol. Previo a la comparación con el estándar se debe tomar en consideración picos importantes en el espectro que deben estar presentes, debido a la estructura de la molécula, tal es el caso del pico característico del grupo OH presente en la molécula, este grupo tiene una banda característica que aparece entre 3400 y 3650 cm^{-1} , otro pico importante es uno del anillo aromático del eugenol que aparece entre 1450 y 1600 cm^{-1} , estos dos picos nos permiten saber que tenemos un compuesto con características similares a nuestro analito, pero aun no podemos afirmar que esté presente, por ello es necesario el contrastar los espectros obtenidos con el estándar, porque la parte principal que nos permite identificar el compuesto es la zona de la huella digital y ésta precisamente es la que debe ser comparada con el nuestro estándar.

En el estudio realizado el equipo, FTIR Spectrum BX de la marca Perkin Elmer, cuenta con el acople ATR Miracle que nos permite utilizar una cantidad muy baja de muestra para

obtener el correspondiente espectro, lo que fue de mucha utilidad debido a que las muestras de albahaca, tanto la de sal como la de dulce, contiene eugenol en pequeña proporción y fue necesario utilizar un hisopo de algodón para coleccionar nuestro analito, que se encontraba disperso en los balones luego del proceso de rotoevaporación. Los resultados obtenidos fueron muy buenos y se pueden visualizar en el Anexo 5 que contiene todos los espectros de las muestras y duplicados analizados tanto de la albahaca de sal como de la de dulce.

En la Figura 3.1 podemos encontrar el espectro del estándar de eugenol con el que se contrastaron todas las muestras de este trabajo.

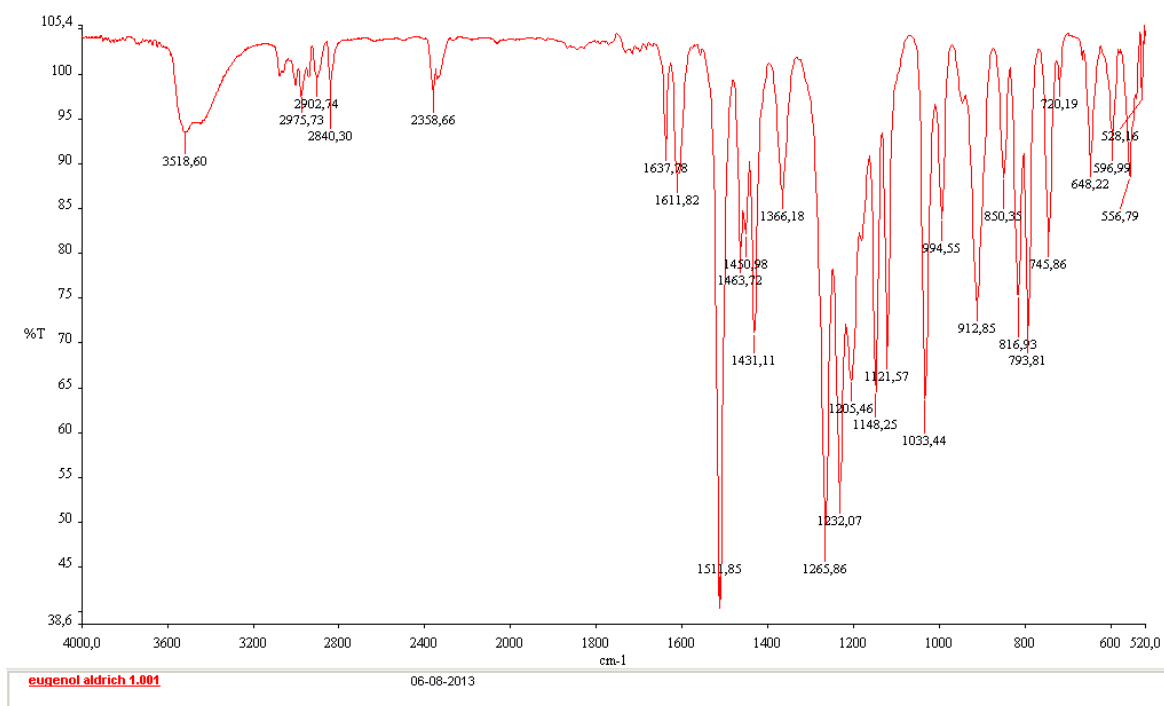


Figura 3.1 Espectro IR de estándar de eugenol marca Aldrich

Para tener una idea de cómo se contrastó los espectros, la Figura 3.2 nos muestra la superposición de un espectro obtenido de una muestra y el correspondiente estándar.

En la Figura 3.2 podemos apreciar como todos los picos a lo largo del espectro coinciden y están presentes, lo que nos permite afirmar que lo obtenido es sin duda alguna eugenol.

Además el software del equipo nos permite obtener el porcentaje de correlación entre los dos espectros siendo en este caso 98,02%

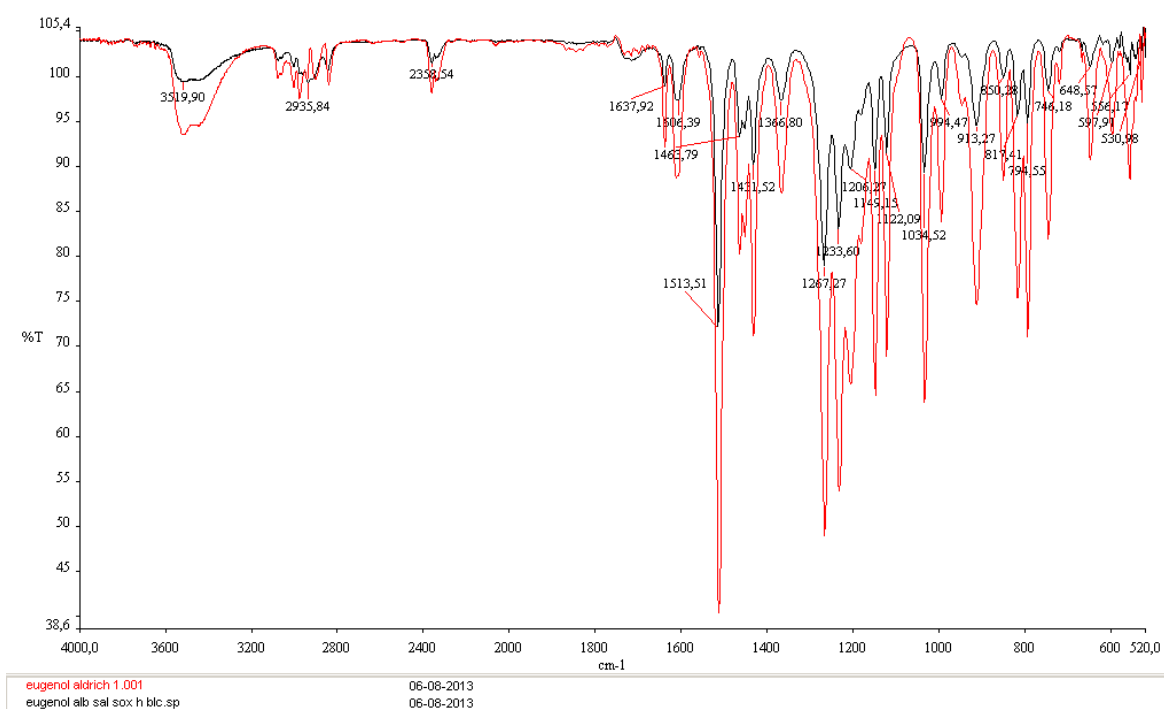


Figura 3.2 Comparación de espectros entre una muestra de albahaca de sal y el estándar

En cuanto a las muestras y el estándar se obtuvo un promedio de porcentaje de correlación para la albahaca de sal de 96,61% y para la albahaca de dulce un 94,12%. Estos datos nos permiten afirmar que el producto de nuestras extracciones y aislamiento es eugenol en su gran mayoría, que presenta algunas impurezas que son las que hacen que la correlación con el estándar de eugenol con pureza del 99%, tenga pequeñas diferencias.

Las principales impurezas presentes en el aislamiento de eugenol pueden ser el isoeugenol o cualquier otro tipo de compuesto fenólico que puede ser extraído con el aceite esencial y en el proceso de aislamiento también puede reaccionar con el ácido y la base, de esta manera se explica los porcentajes de correlación entre las muestras y el estándar.

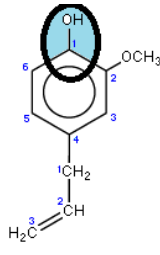
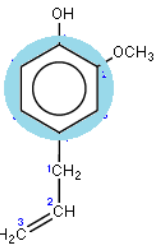
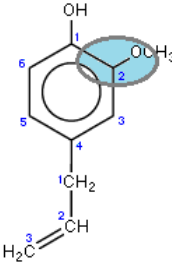
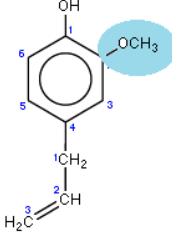
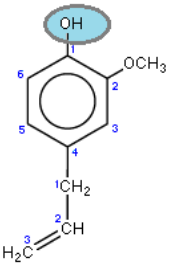
En la literatura se dice que el coeficiente de correlación que va entre 0 y 1 tiene una relación muy alta si es superior a 0,8 llevado a porcentaje el valor es del 80%, lo que aplicado al presente estudio nos permite afirmar que la correlación de nuestros espectros, que es superior al 90% en todos los casos, es muy alta y por ello se dice que la identificación del eugenol es positiva.

Con la espectrometría de UV/VIS pudimos obtener el espectro de barrido o scan del estándar de eugenol, pero no así de las muestras de albahaca, debido principalmente a que la cantidad de eugenol en las muestras era mínima y de esa pequeña cantidad la mayoría se utilizaba en el análisis de espectrofotometría IR, lo que dejó una cantidad insuficiente de muestra para poder ser analizada por la espectrofotometría de UV/VIS. Se buscó obtener un espectro de todas las muestras de albahaca de sal y de dulce por separado, para ello se llevo a solución en hexano todo el eugenol de muestras y duplicados pero aún así el espectro de barrido no pudo ser obtenido.

En cuanto a la comparación del estándar con el espectro obtenido computacionalmente, tampoco se pudo encontrar concordancia, esto debido a que el método y bases probadas aún no son las adecuadas para el cálculo teórico en lo referente a la obtención de espectros UV/Vis, lo que no sucede con los espectros infrarrojos en donde el método y base nos permiten obtener resultados con una correlación hasta del 99.79%

La caracterización computacional se usó para comparar los picos más representativos de los espectros experimentales con los de los computacionales y se observó la diferencia entre ellos, lo que nos permite afirmar que el mejor método y base utilizado resulta ser B3LYP 6-311g. En la Tabla 3.10 podemos observar una comparación entre el estándar y espectros obtenidos computacionalmente con diferentes métodos y bases de cálculo.

Tabla 3.10 Comparación de principales picos entre espectro IR experimental del estándar de eugenol y espectros computacionales

Método	Pico 1 (cm ⁻¹)	Pico 2 (cm ⁻¹)	Pico 3 (cm ⁻¹)	Pico 4 (cm ⁻¹)	Pico 5 (cm ⁻¹)
Estándar	3512,3	1509,33	1265,85	1033,43	556,68
HF 6-31g	3773,29	1682,26	1292,63	1150,7	722,9
B3LYP 6-31g	3751,13	1594,29	1247,17	978,96	341,09
B3LYP 6-311g	3720,22	1576,63	1328,29	1094,17	432,05
Zona de Vibración					
Tipo de vibración	Estiramiento	Estiramiento	Estiramiento	Estiramiento	Tijereteo

De la tabla anterior se puede observar claramente la mayor cercanía del método B3LYP y base 6-311g con el espectro del estándar, esto nos indica que se puede utilizar este espectro computacional como referencia para poder tener una idea de los espectros como obtuvimos de las muestras y que incluso podemos utilizarlo para caracterizar, como es el caso del espectro instrumental del estándar. Lo que hace necesario continuar el estudio de la parte computacional para encontrar otros métodos y bases que nos permitan tener mejores

espectros computacionales que puedan ser contrastados con los de un estándar principalmente en el campo UV/Vis.

La Figura 3.3 muestra un espectro obtenido computacionalmente mediante método B3LYP y base 6-311g.

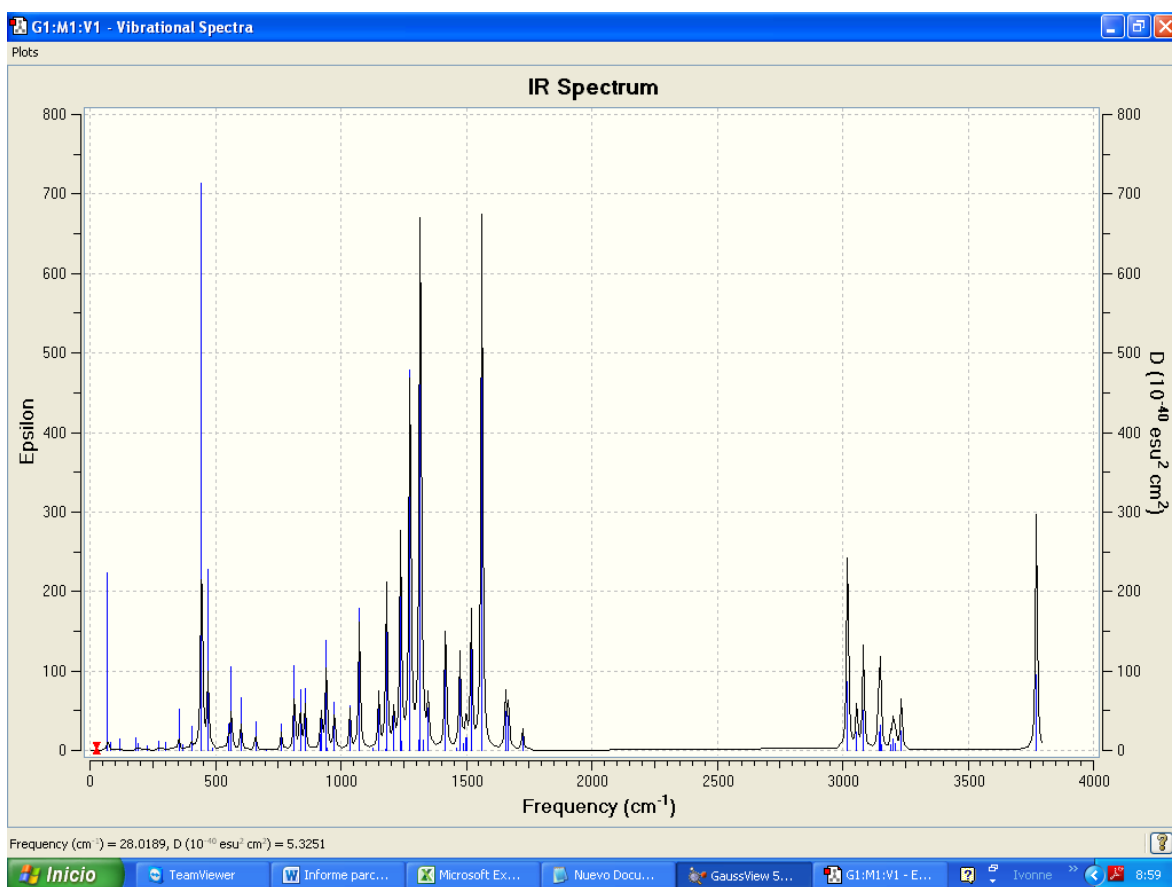


Figura 3.3 Espectro IR obtenido mediante el software Gauss View 4.1.2 y Gaussian 03

Las bandas obtenidas en los espectros computacionales, son comprable a los experimentales tanto en número de onda (cm⁻¹) como en intensidad, sin embargo, la amplitud de los picos no son comparables, ya que el programa computacional no está diseñado para calcular distintos anchos de banda.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

- La caracterización del eugenol obtenido de las muestras de albahaca, permite determinar que el método de aislamiento de este compuesto utilizado para el clavo de olor, es adecuado para emplearlo con la albahaca, debido a que se obtuvieron espectros bien definidos y contrastables con el estándar, sin tener mayores variaciones entre ellos, lo que indica un buen nivel de pureza del eugenol aislado.
- En el caso de la caracterización por espectrofotometría UV/VIS, se comprobó que la cantidad tan pequeña de eugenol obtenida no permite obtener el espectro de barrido buscado, sin embargo, esta técnica es complementaria para identificación, y por ello no puede compararse con la caracterización realizada por espectrofotometría de infrarrojos, que si resulta ser específica.
- Se demostró que los espectros computacionales pueden servir de guía para el estudio propuesto, incluso podrían ser utilizados para la caracterización de este compuesto, debido a que la diferencia entre estos y un espectro obtenido instrumentalmente de un estándar es poco significativa.

- Mediante el análisis estadístico realizado (ANOVA), se pudo demostrar que existen diferencias significativas entre los tres métodos de extracción, lo que indica que la diferencia radica precisamente en los métodos, más no en los errores propios del análisis experimental.
- La extracción de aceite esencial mediante arrastre de vapor, método vapor vivo, resultó ser la de mejor resultado, tomando en consideración dos aspectos, primero el rendimiento que fue de 0,03% en promedio, y segundo que la cantidad de solvente necesario, al final de todo el proceso de extracción y aislamiento, es mucho menor que el de extracción soxhlet.
- El método de extracción soxhlet presentó un promedio de rendimiento del 0,04% siendo superior a las dos extracciones acuosas, pero la cantidad de solvente utilizado hasta el final del proceso es muy alta, llegando a usarse 160 mL de hexano por muestra, lo que no es amigable con el medio ambiente.

4.2 RECOMENDACIONES

- Se sugiere buscar nuevos métodos y bases de cálculo, en el campo de la química computacional, para poder disponer de mejores espectros y que puedan ser comparables con los obtenidos instrumentalmente.

- Se recomienda realizar un estudio complementario sobre la obtención de eugenol en diferentes momentos cronológicos de las plantas y en distintas épocas del año, para poder observar si existe variación en las concentraciones de eugenol de acuerdo a las condiciones ambientales a las que está expuesta la planta y el estado de madurez de la misma.
- Es necesario un estudio cromatográfico que nos permite identificar el grado de pureza que se obtiene en el aislamiento de eugenol por medio del procedimiento seguido en este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Damian, P., Damian, K., (1995), *Aromatheray: scent and psyche*, Healing Arts Press, Vermont, USA.
2. Prakash, P., Gupta, Neelu, (2005), *Therapeutic uses of Ocimum sanctum linn (tulsi) with a note on eugenol and its pharmacological actions: a short review*, Indian J Physiol Pharmacol, 49 (2), pp. 125-131.
3. Hiltunen, R., Holm, Y., (2005), *Basil the genus Ocimum*, Overseas Publishers Association, Amsterdam, Netherland.
4. Rama, M., Sundar, Syama, B., (2013), *Phytochemical constituent and antioxidant activity of extract from the leaves of Ocimum sanctum green and purple*, International Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 2 (2), pp. 55-65.
5. Fonnegra, Gómez, R., Jimenez, Ramirez, S., (2007), Segunda edición, *Plantas medicinales aprobadas en Colombia*, Editorial Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
6. MDidea, *Ocimum basilicum*, <http://www.mdidea.com/products/proper/proper08602.html>, 06 de febrero de 2014.
7. Biblioteca digital de la medicina tradicional Mexicana de la UNAM, *Albahaca medicina tradicional*, <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t&id=7195>, 07 de febrero de 2014.

8. Nicolás, J., (2013), *Manual de plantas medicinales del altiplano de Guatemala para el uso familiar*, Asociación de Médicos descalzos, Guatemala.
9. Meléndez, E., (2006), *Plantas medicinales de Puerto Rico: folklore y fundamentos científicos*, Editorial de la Universidad de Puerto Rico, San Juan, Puerto Rico.
10. Rosero, C., Camacho, R., Polanco, M., Gómez, S., (2009), *Efecto relajante de las hojas de *Ocimum basilicum* y *Foeniculum vulgare* colombianas en ílion aislado de rata*, Univ. Med., Colombia, 50 (1), pp. 98-109.
11. Rojas, M., Sánchez, Y., Abreu, Y., Espinosa, I., Correa, T., Pino, O., (2012), *Caracterización química y actividad antibacteriana de aceites esenciales de *Ocimum basilicum* y *Ocimum basilicum* var. *genovese**, Revista de Protección Vegetal, 27 (2), pp. 130-134.
12. Beltrán, M., Maldonado, M., Vivas, A., (2013), *Actividad antibacteriana de los aceites obtenidos de *Ocimum basilicum* L. var. *cinammom*, *O. album*, *O. thyrsoiflorum*, para uso potencial en fitocosmética*, Investigaciones Andina, 15 (27), pp.798-810.
13. Global information Hub on integrated Medicine, *Ocimum americanum*, http://www.globinmed.com/index.php?option=com_content&view=article&id=79925:ocimum-americanum-1, 10 de febrero de 2014.
14. Tan, Hugh, T. W.,(2005), *Herbs and spieces of Thailand*, Marshall Cavendish International, Singapore.
15. Oroz, R., (2004), duodécima edición, *Diccionario de la lengua castellana*, Editorial Universitaria S.A., Santiago de Chile.

16. Leclerc, Buffon, G., (1967), *Los tres reinos de la naturaleza o museo pintoresco de historia natural, tomo VIII, Botánica*, Gaspar y Roig editores, Madrid.
17. Pattnaik, Sitakanta, C., (1996), *In vitro propagation of the medicinal herbs Ocimum americanum L. syn. O. canum Sims. (hoary basil) and Ocimum sanctum L. (holy basil)*, Plant Cell Reports, 15(11), pp. 846-850.
18. Dixon, R.,A., (2001), *Natural products and plant disease resistance*, Nature, 411, pp. 843-847.
19. Ocampo, R., Ríos, L., Betancur, L., Ocampo, D., (2008), *Curso práctico de Química Orgánica. Enfocado a Biología y Alimentos*, Editorial Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.
20. García, A., Pérez-Urria, E., (2009), *Metabolismo secundario de plantas*, Reduca Serie Fisiología Vegetal, 2(3), pp. 119-145.
21. Arango, G., (2010), *Introducción al metabolismo secundario. Compuestos derivados del ácido Shikímico*, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
22. Gonzales, R., (2002), *Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso*, Revista cubana de Estomatología, 39 (2), pp. 139-156.
23. Merck Millipore, *hoja de seguridad eugenol*, <http://www.merck-chemicals.com>, 15 de marzo de 2014.
24. Alfredo, E., Soares de Souza, E., Marchesan, M., Paulino, S., Gariba-Silva, R., Sousa-Neto, M., (2006), *Effect of eugenol-based endodontic cement on the adhesion of intraradicular post*, Brazilian Dental Journal, 17 (2), pp. 130-133.

25. Huang, F., Tai, K., Chou, M., Chang, Y., (2002), *Cytotoxicity of resin-, zinc oxide–eugenol-, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells*, International Endodontic Journal, 35 (2), pp. 153-158.
26. Nicolás, M., Marín, E., Castro, F., Miranda, F., (2006), *Algunos aspectos básicos de la química computacional*, Comité editorial Facultad de estudios superiores Cuautitlán UNAM, México D.F.
27. Atkins, P., De Paula, J., (2006), *Atkins´ Physical Chemistry*, Oxford University Press, 8.º Ed., Oxford.
28. Instituto de Ciencias Físicas UNAM, *conceptos básicos de química computacional*, <http://www.fis.unam.mx/~ramon/CursoDF/Material%20Didactico/Varios/Principios%20Quimica%20Computacional%203%20Edicion.pdf>, 15 de marzo de 2014.
29. Engel, T. (2006), *Quantum Chemistry & Spectroscopy*, Pearson Education Inc., USA.
30. Young, D., (2001), *Computational Chemistry A practical guide for applying techniques to Real-World problems*, John Wiley & Sons Inc., USA.
31. Ramachandra, K., (2008), *Computational Chemistry and Molecular Modeling principles and applications*, Springer-Verlag, UK.
32. Foresman, J., (1996), *Exploring Chemistry with electronic structure methods*, segunda edición, Gaussian Inc., USA.
33. Ecured, *Aplicaciones de Química computacional*, http://www.ecured.cu/index.php/Qu%C3%ADmica_Computacional, 15 de marzo de 2014.

34. Universidad de Valencia, *Aplicaciones de Química computacional*, http://www.uv.es/tunon/QComp/Sesion_QC_Entorno.pdf, 15 de marzo de 2014.
35. Fieser, L., (1985), *Química Orgánica Fundamental*, Editorial Reverté S.A., Barcelona, España.
36. Lamarque, A., Zygadlo, J., Labuckas, D., López, L., Torres, M., Maestri, D., (2008), *Fundamentos teórico-prácticos de Química Orgánica*, Editorial Encuentro, Córdoba, Argentina.
37. Sanz, I., Raigón, M., Llorens, J., Llopis, R., (2002), *Prácticas de Química Orgánica*, Editorial Universidad Politécnica de Valencia, España.
38. Aguilar, M., (1999), *Introducción a los equilibrios Iónicos*, Editorial Reverté S. A., Barcelona, España.
39. Valenzuela, C., (1995), *Química General: Introducción a la Química Teórica*, Ediciones Universidad de Salamanca, España.
40. Martínez-Alvarez, R., Rodríguez, M., Sánchez, L., (2005), *Química: un proyecto de la ACS*, Editorial Reverté S.A., Barcelona, España.
41. Olsen, E., (1990), *Métodos ópticos de análisis*, Editorial Reverté S.A., Barcelona, España.
42. Skoog, D., West, D., (1986), *Introducción a la Química Analítica*, Editorial Reverté S.A., Barcelona, España.
43. Sun, D., (2009), *Infrared Spectroscopy for food quality analysis and control*, Elsevier, New York, USA.

44. Clarck, B., Frost, T., Rusell, M., (1993), *UV Spectroscopy Techniques, instrumentation data handling*, Chapman & Hall, Londres, Reino Unido.
45. Pino, F., Perez, D., (1983), *Análisis de elementos-traza por espectrofotometría de absorción molecular uv-visible*, Universidad de Sevilla, España.
46. Universidad del país Vasco, *vibraciones en el infrarrojo*, <http://www.ehu.es/imacris/PIE06/web/IR.htm>, 18 de marzo de 2014.
47. Sierra, I., Gómez, S., Quintanilla, D., Morante, S., (2010), *Análisis Instrumental*, Netbiblo S. L., La Coruña, España.
48. Mc. Murry, J., (2012), *Química Orgánica*, Cengage Learning Editores, USA.
49. Moore, D., (2000), *Estadística aplica básica*, Antoni Bosch Editor S.A., España.
50. Sokal, R., Rohlf, J., (2002), *Introducción a la Bioestadística*, Editorial Reverté S.A., Barcelona, España.
51. UNEG, *Tabla ANOVA*, http://www.egrupos.net/grupo/prufai/ficheros/3/verFichero/21/T%C3%A9cnica%20ANOVA%20y%20Cuadro%20Resumen%20_PRUF_AI_.pdf., 30 de marzo de 2014.
52. Universidad Nacional de la Amazonía peruana, *Prospección y producción de aceite esencial de Aniba rosaeodora Ducke. Lauraceae (Palo de rosa)*, <http://www.iiap.org.pe/Upload/Publicacion/PUBL1342.pdf>, 17 de junio de 2014.
53. Vanaclocha, B., Cañigüeral, S., (2003), *Fitoterapia Vademécum de prescripción*, Elsevier, Barcelona, España.

ANEXOS

ANEXO 1 : Absorciones características de algunos grupos funcionales[40]

Absorciones características en el IR de algunos grupos funcionales

Grupo funcional	Absorción (cm ⁻¹)	Intensidad	Grupo funcional	Absorción (cm ⁻¹)	Intensidad
Alcano			Amina		
C-H	2850-2960	Media	N-H	3300-3500	Media
Alqueno			C-N	1030-1230	Media
=C-H	3020-3100	Media	Compuesto carbonilo		
C=C	1640-1680	Media	C=O	1670-1780	Fuerte
Alquino			Aldehído	1730	Fuerte
=C-H	3300	Fuerte	Cetona	1715	Fuerte
C≡C	2100-2260	Media	Éster	1735	Fuerte
Halogenuro de alquilo			Amida	1690	Fuerte
C-Cl	600-800	Fuerte	Ácido carboxílico	1710	Fuerte
C-Br	500-600	Fuerte	Ácido carboxílico		
Alcohol			O-H	2500-3100	Fuerte, amplia
O-H	3400-3650	Fuerte, amplia	Nitrilo		
C-O	1050-1150	Fuerte	C≡N	2210-2260	Media
Areno			Nitro		
C-H	3030	Débil	NO ₂	1540	Fuerte
Anillo aromático	1660-2000	Débil			
	1450-1600	Media			

ANEXO 2 : Certificado de análisis Eugenol Sigma - Aldrich

Certificado de análisis Eugenol Sigma - Aldrich

SIGMA-ALDRICH®

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

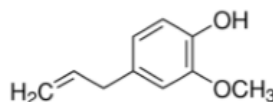
Email USA: techserv@sial.com

Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name:
Eugenol - 99%

Product Number: E51791
Lot Number: MKBJ0904V
Brand: ALDRICH
CAS Number: 97-53-0
MDL Number: MFCD00008654
Formula: C10H12O2
Formula Weight: 164.2 g/mol
Quality Release Date: 23 SEP 2011

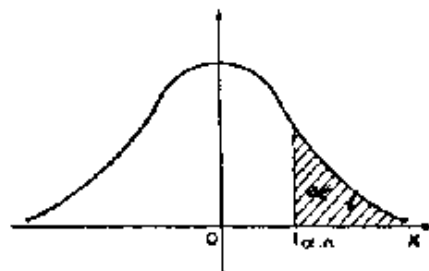


Test	Specification	Result
Appearance (Color)	Colorless to Dark Yellow	Colorless
Appearance (Form)	Liquid	Liquid
Infrared spectrum	Conforms to Structure	Conforms
Purity (GC)	≥ 98.5 %	98.7 %

Jamie Gleason

Jamie Gleason, Manager
Quality Control
Milwaukee, Wisconsin US

ANEXO 3: Tabla de distribución t de Student



$\alpha/2$ g/	0,40	0,30	0,20	0,10	0,050	0,025	0,010	0,005	0,001	0,0005
1	0,325	0,727	1,376	3,078	6,314	12,71	31,82	63,66	318,3	636,6
2	0,289	0,617	1,061	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	22,33	31,60
3	0,277	0,584	0,978	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	10,22	12,94
4	0,271	0,569	0,941	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	7,173	8,610
5	0,267	0,559	0,920	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	5,893	6,859
6	0,265	0,553	0,906	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,208	5,959
7	0,263	0,549	0,896	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	4,785	5,405
8	0,262	0,546	0,889	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	4,501	5,041
9	0,261	0,543	0,883	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,297	4,781
10	0,260	0,542	0,879	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,144	4,587
11	0,260	0,540	0,876	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,025	4,437
12	0,259	0,539	0,873	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	3,930	4,318
13	0,259	0,538	0,870	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	3,852	4,221
14	0,258	0,537	0,868	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	3,787	4,140
15	0,258	0,536	0,866	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	3,733	4,073
16	0,258	0,535	0,865	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	3,686	4,015
17	0,257	0,534	0,863	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,646	3,965
18	0,257	0,534	0,862	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,611	3,922
19	0,257	0,533	0,861	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,579	3,883
20	0,257	0,533	0,860	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,552	3,850
21	0,257	0,532	0,859	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,527	3,819
22	0,256	0,532	0,858	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,505	3,792
23	0,256	0,532	0,858	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,485	3,767
24	0,256	0,531	0,857	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,467	3,745
25	0,256	0,531	0,856	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,450	3,725
26	0,256	0,531	0,856	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,435	3,707
27	0,256	0,531	0,855	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,421	3,690
28	0,256	0,530	0,855	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,408	3,674
29	0,256	0,530	0,854	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,396	3,659
30	0,256	0,530	0,854	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,385	3,646
40	0,255	0,529	0,851	1,303	1,648	2,021	2,423	2,704	3,307	3,551
50	0,255	0,528	0,849	1,298	1,676	2,009	2,403	2,678	3,262	3,495
60	0,254	0,527	0,848	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660	3,232	3,460
80	0,254	0,527	0,846	1,292	1,664	1,990	2,374	2,639	3,195	3,415
100	0,254	0,526	0,845	1,290	1,660	1,984	2,365	2,626	3,174	3,389
200	0,254	0,525	0,843	1,286	1,653	1,972	2,345	2,601	3,131	3,339
500	0,253	0,525	0,842	1,283	1,648	1,965	2,334	2,586	3,106	3,310
∞	0,253	0,524	0,842	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	3,090	3,291

ANEXO 4: Tabla de distribución F con confianza del 95%

F Table for alpha=.05

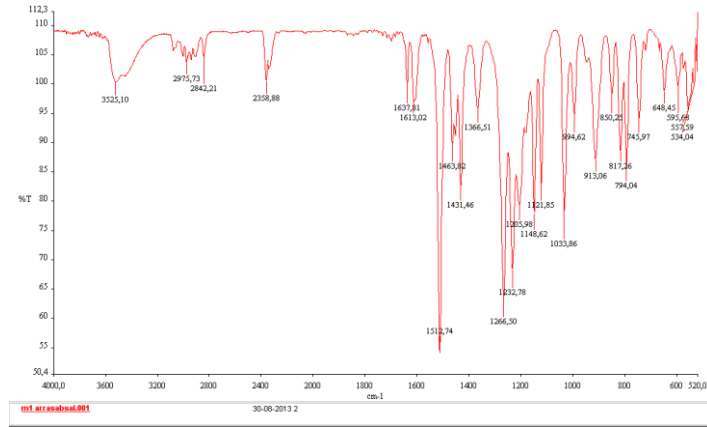


df2/df1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	60	120	inf
1	161.4476	199.5000	215.7073	224.5832	230.1610	233.9860	236.7684	238.8827	240.5433	241.8817	243.0060	245.9499	248.0131	249.0518	250.0051	251.1432	252.1957	253.2520	254.3144
2	18.5128	19.0000	19.1643	19.2468	19.2964	19.3295	19.3532	19.3710	19.3848	19.3950	19.4125	19.4291	19.4458	19.4541	19.4624	19.4707	19.4791	19.4874	19.4957
3	10.1280	9.5521	9.2766	9.1172	9.0135	8.9406	8.8867	8.8452	8.8123	8.7855	8.7446	8.7029	8.6602	8.6285	8.6166	8.5944	8.5720	8.5496	8.5264
4	7.7086	6.9443	6.5914	6.3882	6.2561	6.1531	6.0942	6.0410	5.9988	5.9644	5.9117	5.8578	5.8025	5.7744	5.7459	5.7170	5.6877	5.6581	5.6281
5	6.5019	5.7861	5.4099	5.1922	5.0303	4.9503	4.8759	4.8192	4.7725	4.7351	4.6777	4.6188	4.5581	4.5272	4.4957	4.4638	4.4314	4.3985	4.3650
6	5.9874	5.1433	4.7571	4.5337	4.3824	4.2839	4.2067	4.1468	4.0980	4.0500	3.9999	3.9381	3.8742	3.8415	3.8082	3.7743	3.7398	3.7047	3.6689
7	5.5914	4.7374	4.3468	4.1203	3.9715	3.8650	3.7870	3.7257	3.6767	3.6295	3.5747	3.5107	3.4445	3.4105	3.3756	3.3404	3.3043	3.2674	3.2298
8	5.1177	4.4500	4.0662	3.8379	3.6875	3.5806	3.5005	3.4381	3.3881	3.3472	3.2830	3.2184	3.1503	3.1152	3.0794	3.0428	3.0053	2.9668	2.9276
9	5.1174	4.2565	3.8825	3.6531	3.4817	3.3738	3.2927	3.2296	3.1789	3.1373	3.0720	3.0061	2.9365	2.9005	2.8637	2.8259	2.7872	2.7475	2.7067
10	4.9646	4.1028	3.7089	3.4780	3.3258	3.2172	3.1355	3.0717	3.0204	2.9782	2.9130	2.8450	2.7740	2.7372	2.6996	2.6609	2.6211	2.5801	2.5379
11	4.8443	3.9823	3.5874	3.3567	3.2039	3.0946	3.0123	2.9480	2.8962	2.8535	2.7876	2.7186	2.6464	2.6090	2.5705	2.5309	2.4901	2.4480	2.4045
12	4.7472	3.8853	3.4903	3.2592	3.1059	2.9961	2.9134	2.8486	2.7964	2.7534	2.6866	2.6169	2.5436	2.5055	2.4663	2.4259	2.3842	2.3410	2.2962
13	4.6672	3.8056	3.4105	3.1791	3.0254	2.9153	2.8321	2.7669	2.7144	2.6710	2.6037	2.5331	2.4599	2.4202	2.3803	2.3392	2.2966	2.2524	2.2064
14	4.6001	3.7389	3.3439	3.1127	2.9582	2.8477	2.7642	2.6987	2.6458	2.6022	2.5342	2.4630	2.3879	2.3467	2.3062	2.2644	2.2219	2.1778	2.1307
15	4.5431	3.6823	3.2874	3.0566	2.9013	2.7905	2.7066	2.6408	2.5876	2.5437	2.4753	2.4034	2.3275	2.2878	2.2468	2.2043	2.1601	2.1141	2.0658
16	4.4940	3.6337	3.2389	3.0089	2.8534	2.7423	2.6572	2.5911	2.5377	2.4935	2.4247	2.3522	2.2756	2.2354	2.1938	2.1507	2.1058	2.0589	2.0096
17	4.4513	3.5915	3.1966	2.9667	2.8110	2.6997	2.6143	2.5480	2.4943	2.4499	2.3807	2.3077	2.2304	2.1908	2.1477	2.1040	2.0584	2.0107	1.9604
18	4.4139	3.5546	3.1597	2.9297	2.7739	2.6625	2.5769	2.5102	2.4563	2.4117	2.3421	2.2686	2.1906	2.1497	2.1072	2.0629	2.0166	1.9681	1.9188
19	4.3807	3.5219	3.1270	2.8970	2.7411	2.6296	2.5439	2.4769	2.4227	2.3779	2.3080	2.2341	2.1555	2.1141	2.0712	2.0264	1.9795	1.9302	1.8780
20	4.3512	3.4928	3.0979	2.8679	2.7119	2.5999	2.5140	2.4471	2.3928	2.3479	2.2776	2.2033	2.1242	2.0825	2.0391	1.9938	1.9464	1.8963	1.8432
21	4.3248	3.4668	3.0725	2.8425	2.6864	2.5742	2.4881	2.4212	2.3667	2.3210	2.2504	2.1757	2.0960	2.0540	2.0102	1.9645	1.9165	1.8657	1.8117
22	4.3009	3.4434	3.0491	2.8191	2.6629	2.5506	2.4645	2.3976	2.3430	2.2967	2.2258	2.1508	2.0707	2.0283	1.9842	1.9380	1.8894	1.8380	1.7831
23	4.2793	3.4221	3.0280	2.7980	2.6417	2.5293	2.4432	2.3763	2.3217	2.2747	2.2036	2.1282	2.0476	2.0050	1.9605	1.9139	1.8648	1.8128	1.7570
24	4.2597	3.4028	3.0088	2.7783	2.6219	2.5094	2.4233	2.3564	2.3018	2.2547	2.1834	2.1077	2.0267	1.9838	1.9390	1.8920	1.8424	1.7896	1.7330
25	4.2417	3.3852	2.9912	2.7612	2.6047	2.4921	2.4060	2.3391	2.2845	2.2371	2.1656	2.0895	2.0075	1.9643	1.9192	1.8718	1.8217	1.7684	1.7110
26	4.2252	3.3690	2.9752	2.7456	2.5889	2.4762	2.3901	2.3232	2.2686	2.2207	2.1489	2.0725	1.9898	1.9464	1.9010	1.8533	1.8027	1.7488	1.6906
27	4.2100	3.3541	2.9604	2.7308	2.5740	2.4612	2.3751	2.3082	2.2536	2.2057	2.1337	2.0569	1.9736	1.9299	1.8842	1.8361	1.7831	1.7306	1.6717
28	4.1960	3.3404	2.9467	2.7161	2.5592	2.4463	2.3602	2.2933	2.2387	2.1907	2.1185	2.0413	1.9576	1.9135	1.8673	1.8187	1.7653	1.7131	1.6541
29	4.1830	3.3277	2.9340	2.7014	2.5444	2.4314	2.3453	2.2784	2.2238	2.1757	2.1033	2.0258	1.9416	1.8971	1.8505	1.8013	1.7474	1.6951	1.6376
30	4.1709	3.3158	2.9223	2.6896	2.5328	2.4197	2.3336	2.2667	2.2121	2.1639	2.0913	2.0134	1.9288	1.8838	1.8358	1.7853	1.7318	1.6803	1.6232
40	4.0847	3.2317	2.8387	2.6060	2.4491	2.3359	2.2490	2.1820	2.1272	2.0785	2.0055	1.9274	1.8424	1.7973	1.7484	1.6978	1.6453	1.5916	1.5369
60	4.0012	3.1504	2.7581	2.5252	2.3683	2.2551	2.1685	2.1016	2.0468	2.0000	1.9274	1.8394	1.7440	1.7001	1.6491	1.5963	1.5433	1.4879	1.3893
120	3.9211	3.0718	2.6802	2.4472	2.2903	2.1771	2.0905	2.0236	1.9688	1.9220	1.8337	1.7355	1.6387	1.6004	1.5443	1.4902	1.4290	1.3519	1.2539
inf	3.8415	2.9927	2.6009	2.3719	2.2141	2.0989	2.0096	1.9384	1.8799	1.8307	1.7522	1.6664	1.5705	1.5173	1.4591	1.3940	1.3180	1.2214	1.0000

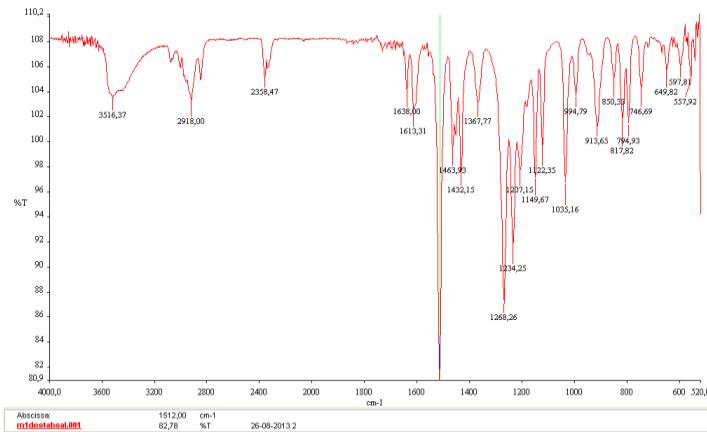
ANEXO 5 : Espectros IR de muestras y duplicados de albahaca de sal y albahaca de dulce

ALBAHACA DE SAL MUESTRA 1

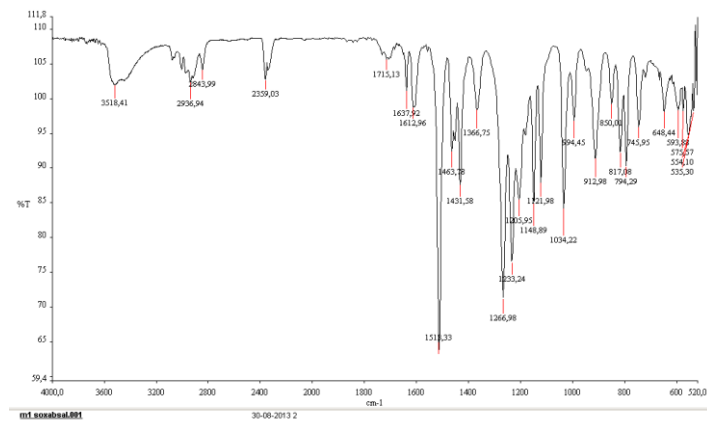
Destilación por arrastre de vapor



Destilación directa

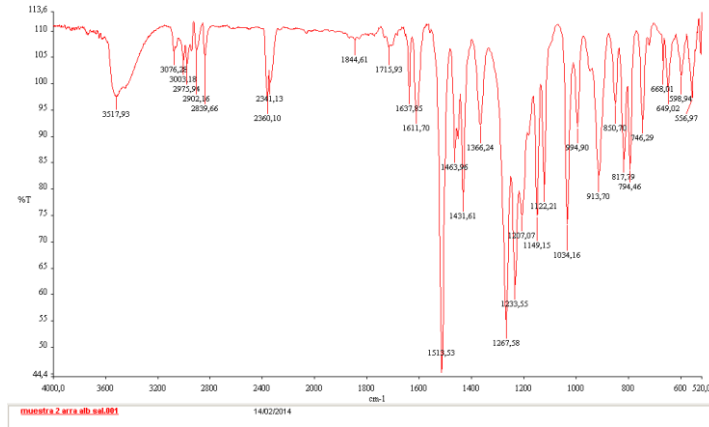


Soxhlet

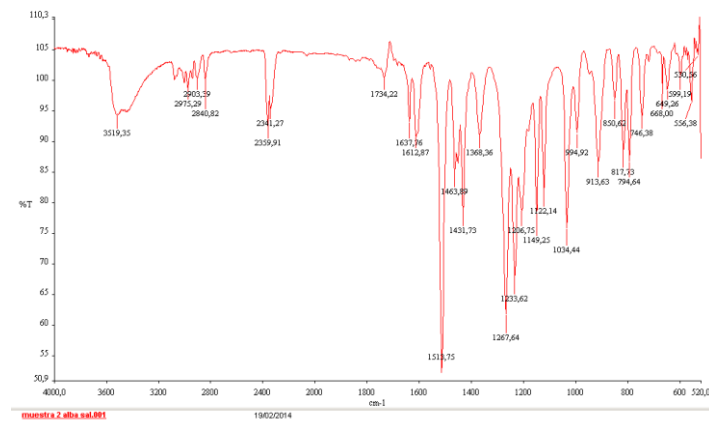


ALBAHACA DE SAL MUESTRA 2

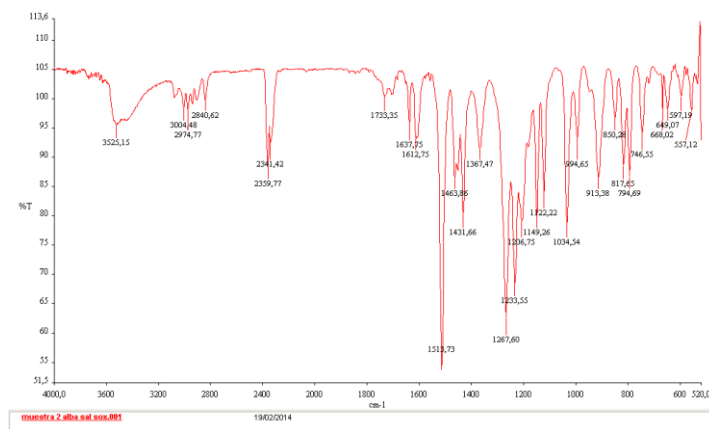
Destilación por arrastre de vapor



Destilación directa

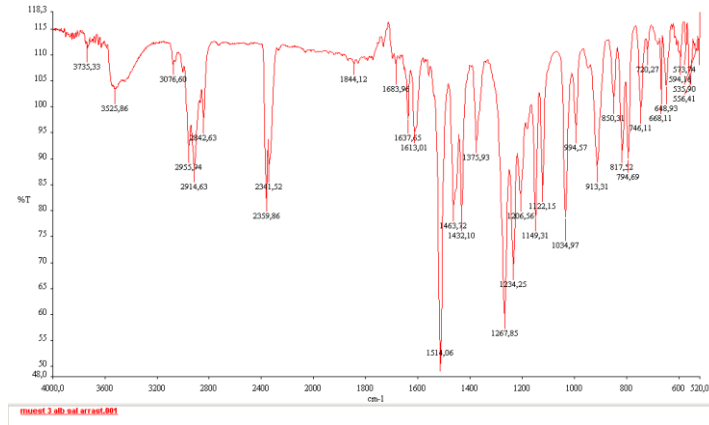


Soxhlet

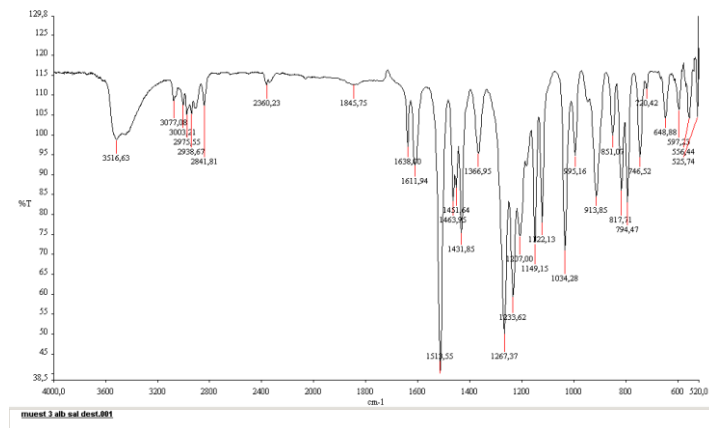


ALBAHACA DE SAL MUESTRA 3

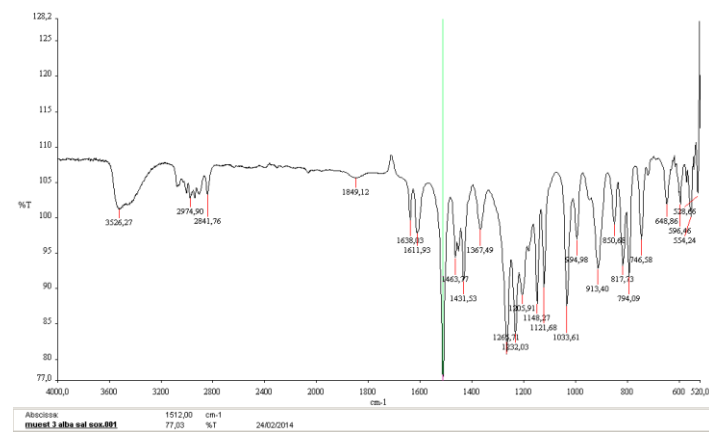
Destilación por arrastre de vapor



Destilación directa

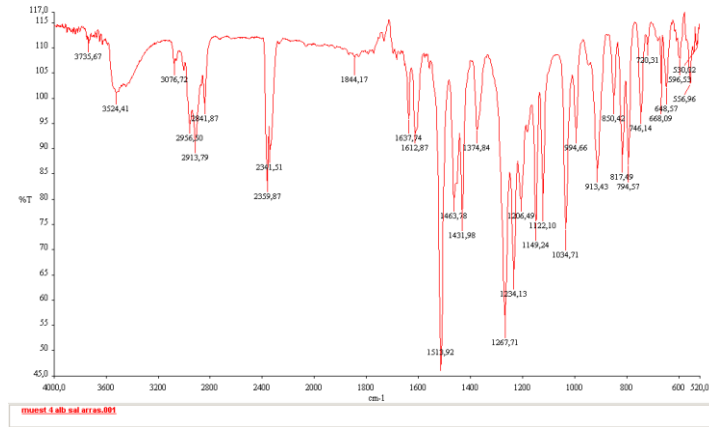


Soxhlet

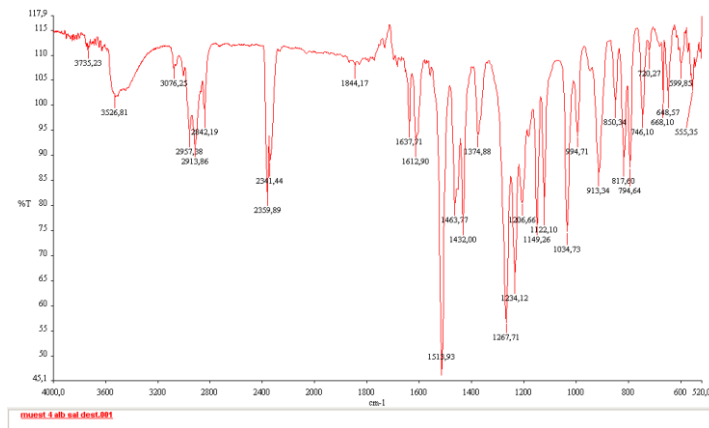


ALBAHACA DE SAL MUESTRA 4

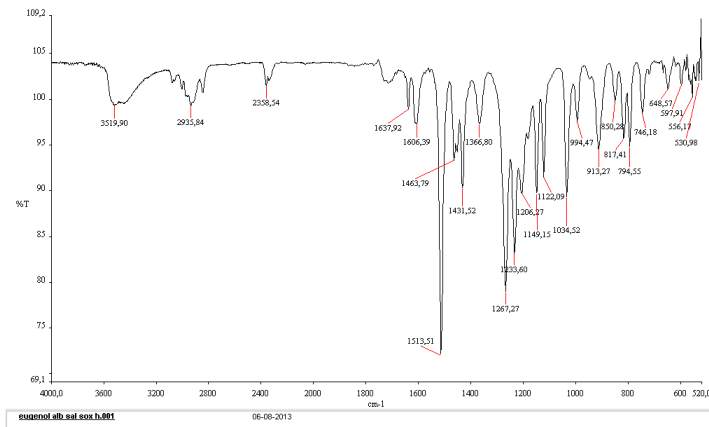
Destilación por arrastre de vapor



Destilación directa

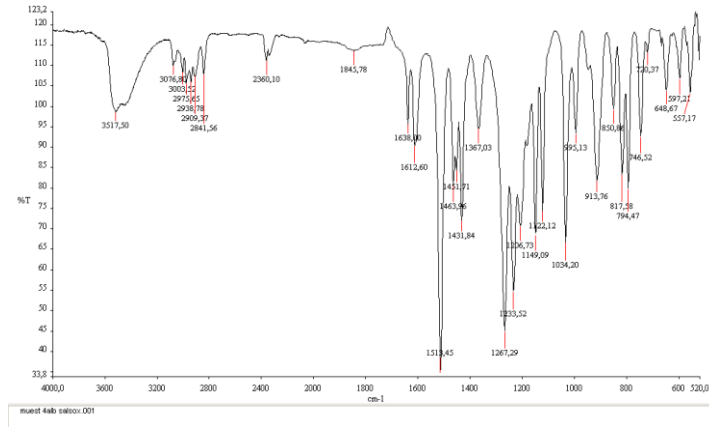


Soxhlet

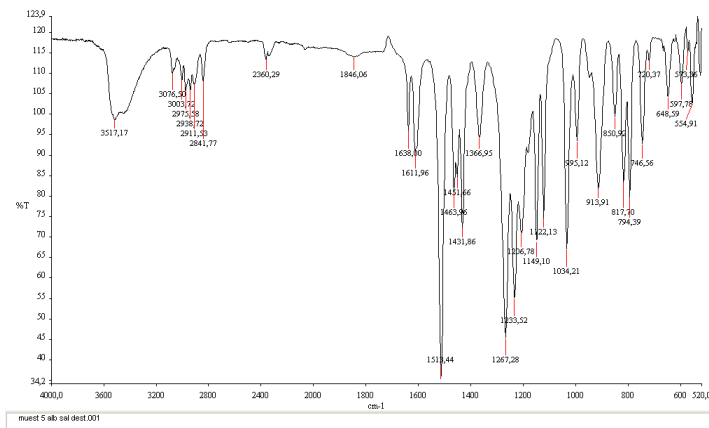


ALBAHACA DE SAL MUESTRA 5

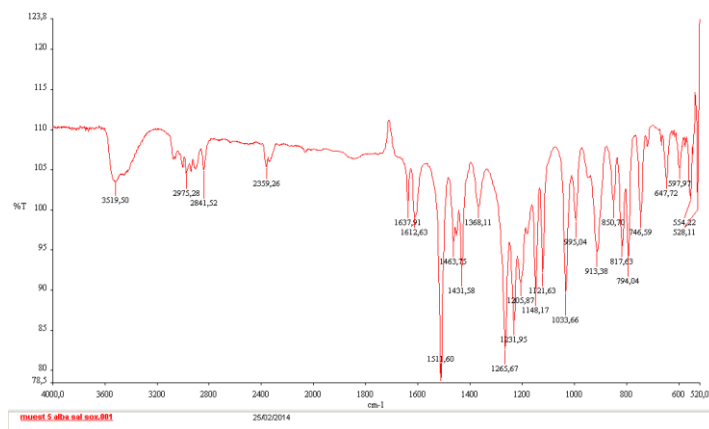
Destilación por arrastre de vapor



Destilación directa

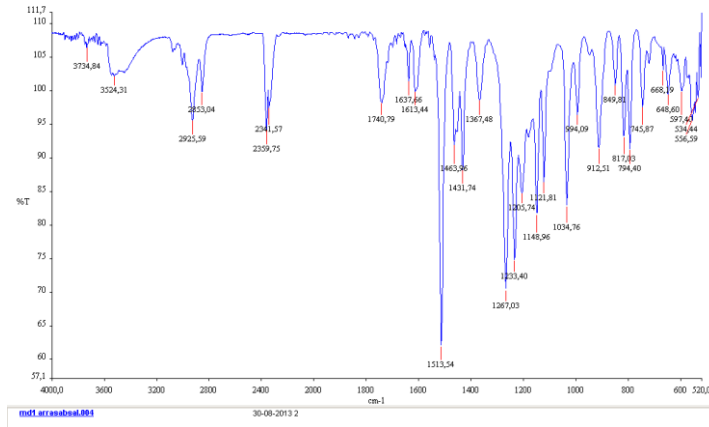


Soxhlet

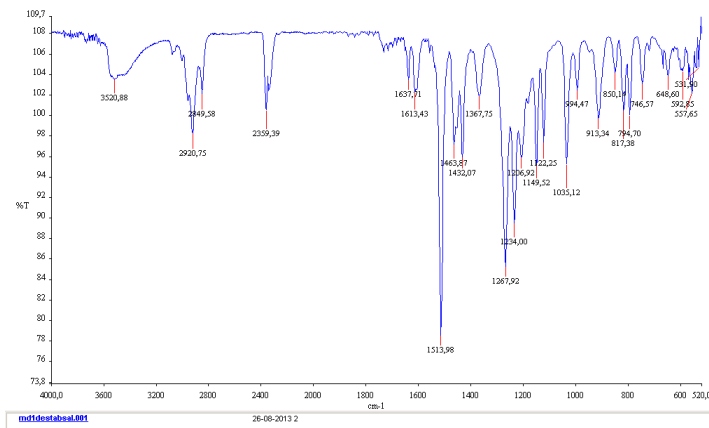


ALBAHACA DE SAL DUPLICADO 1

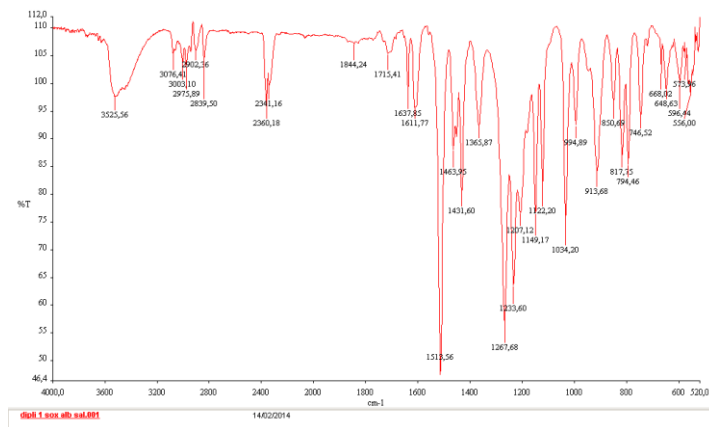
Destilación por arrastre de vapor



Destilación directa

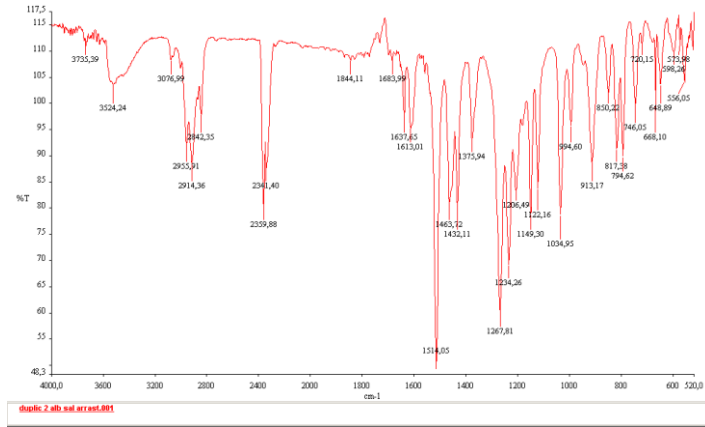


Soxhlet

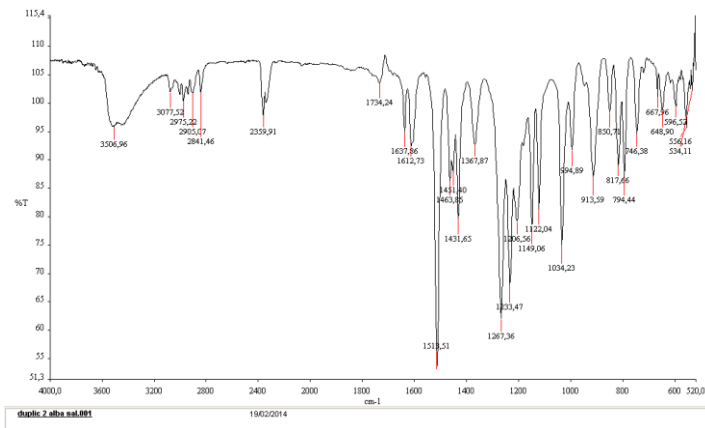


ALBAHACA DE SAL DUPLICADO 2

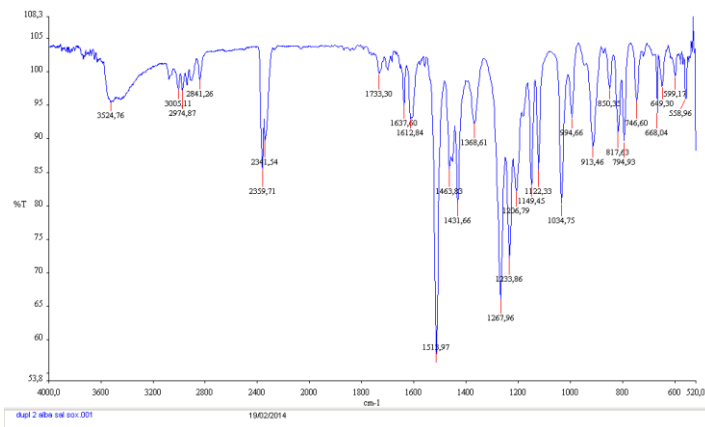
Destilación por arrastre de vapor



Destilación directa

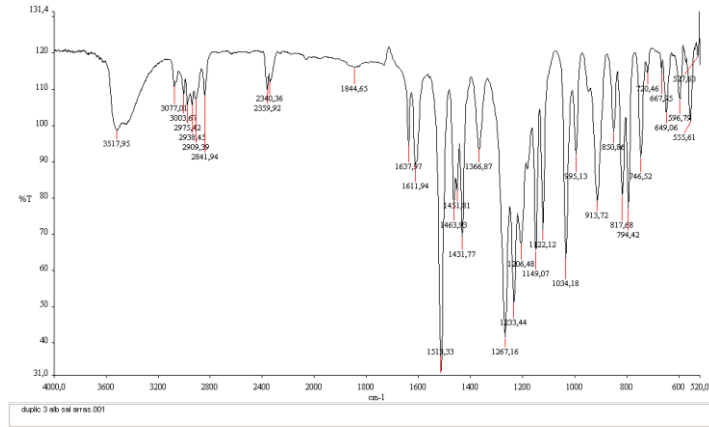


Soxhlet

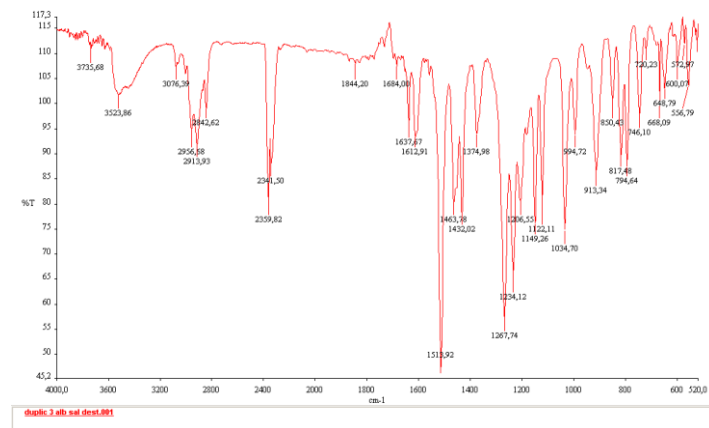


ALBAHACA DE SAL DUPLICADO 3

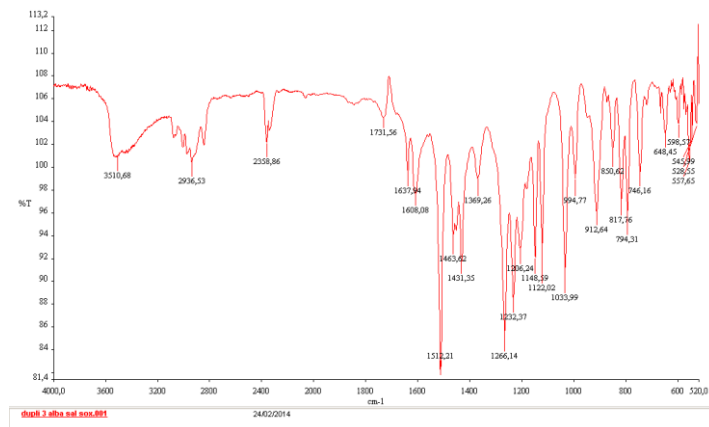
Destilación por arrastre de vapor



Destilación directa

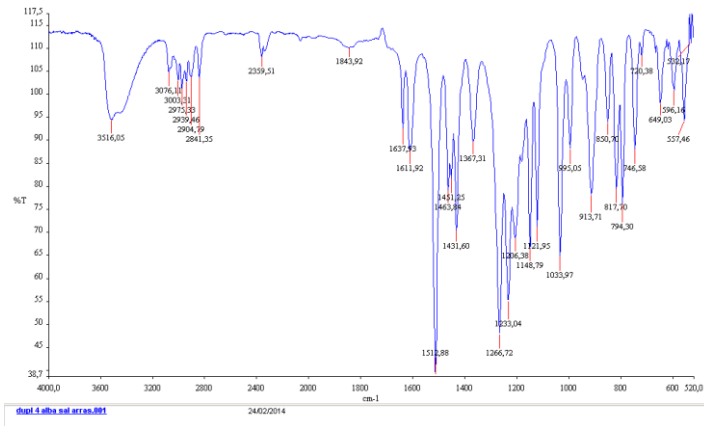


Soxhlet

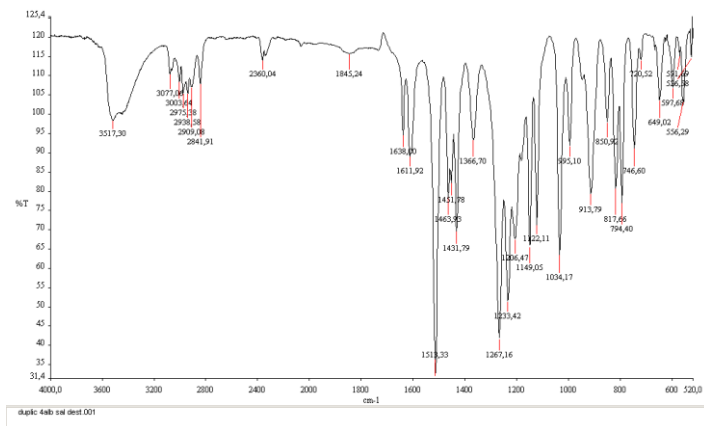


ALBAHACA DE SAL DUPLICADO 4

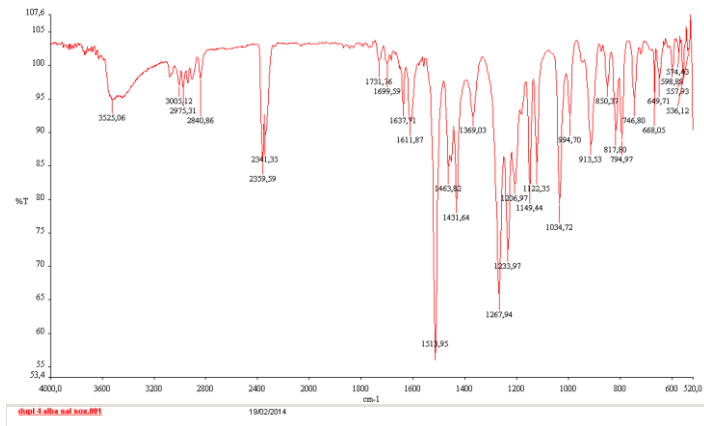
Destilación por arrastre de vapor



Destilación directa

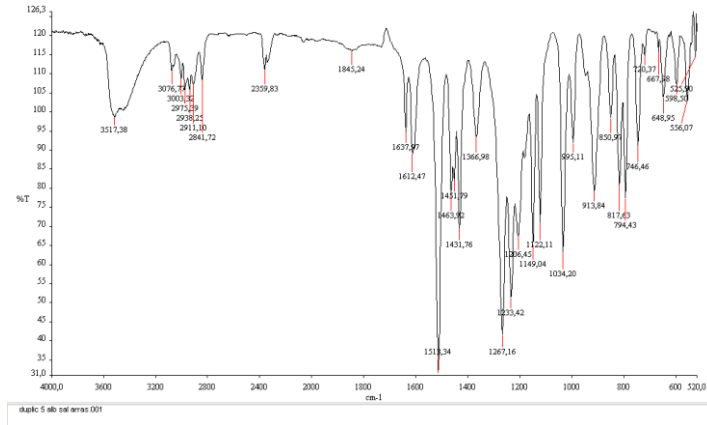


Soxhlet

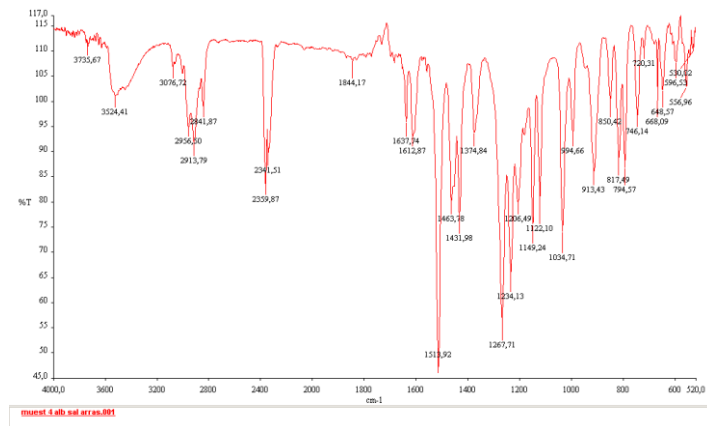


ALBAHACA DE SAL DUPLICADO 5

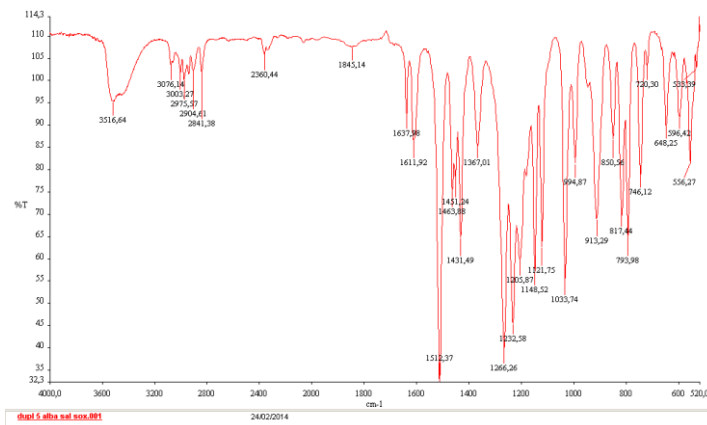
Destilación por arrastre de vapor



Destilación directa

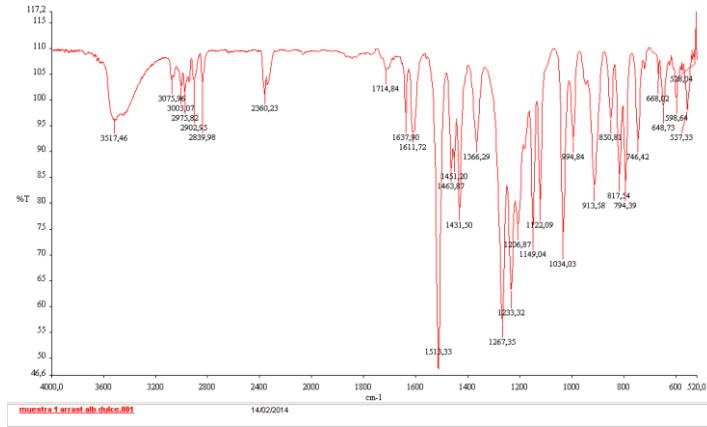


Soxhlet

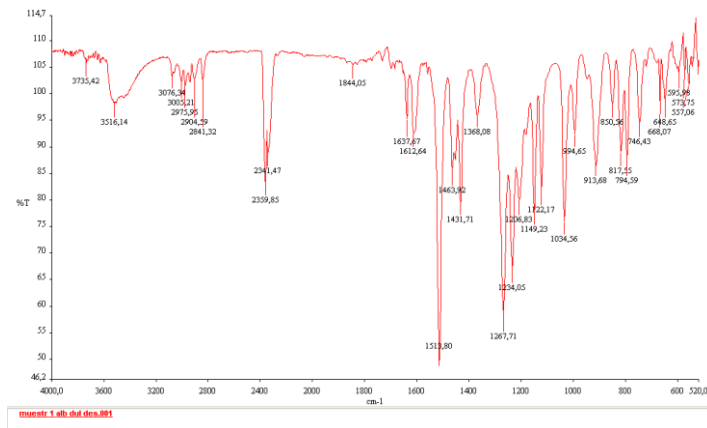


ALBAHACA DE DULCE MUESTRA 1

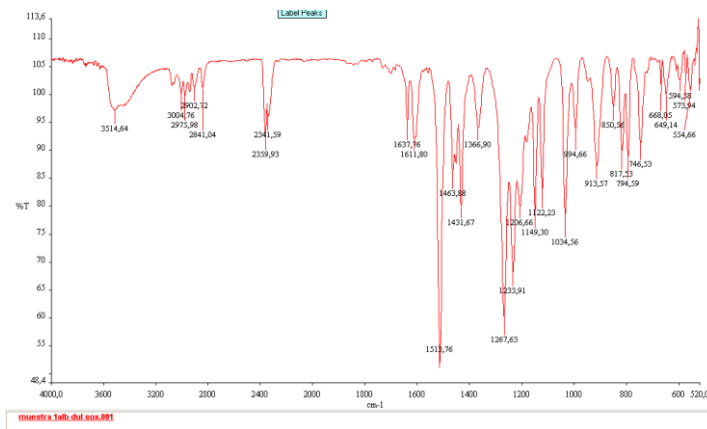
Destilación por arrastre de vapor



Destilación directa

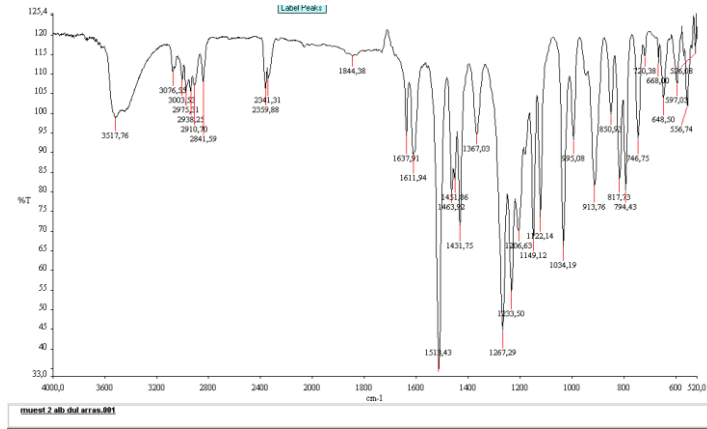


Soxhlet

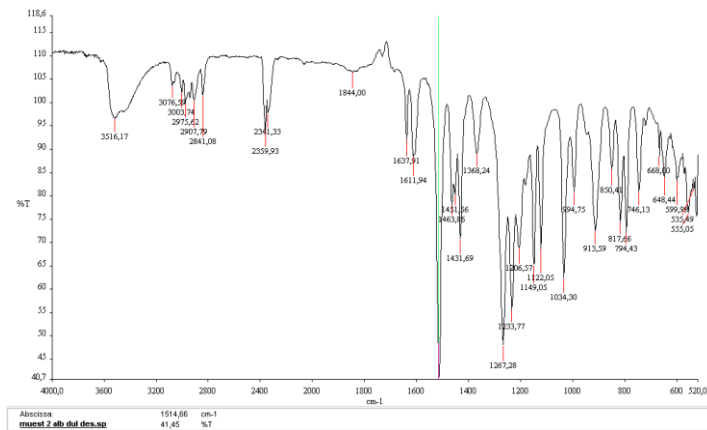


ALBAHACA DE DULCE MUESTRA 2

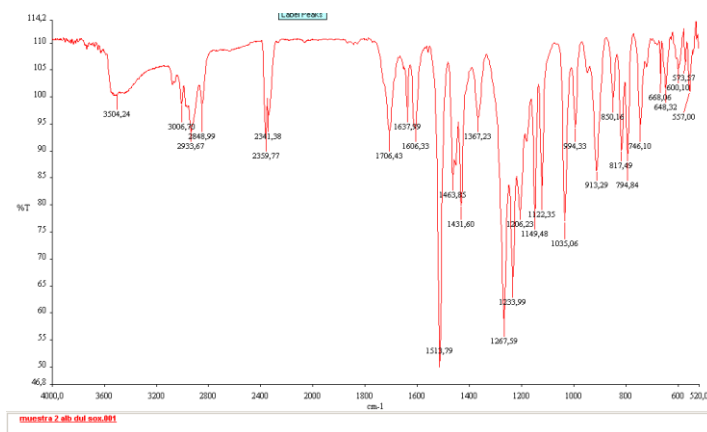
Destilación por arrastre de vapor



Destilación directa

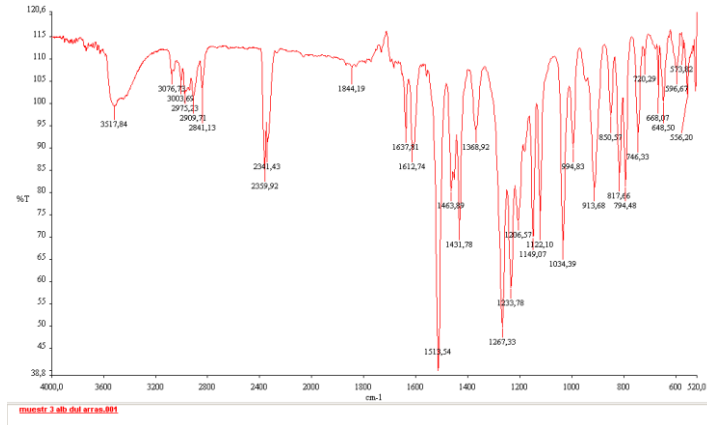


Soxhlet

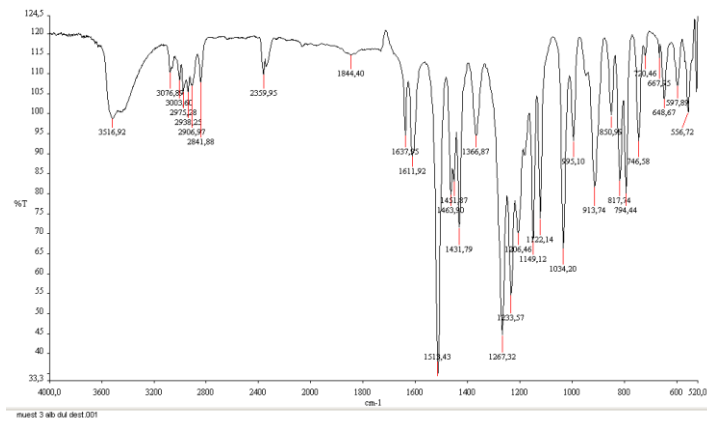


ALBAHACA DE DULCE MUESTRA 3

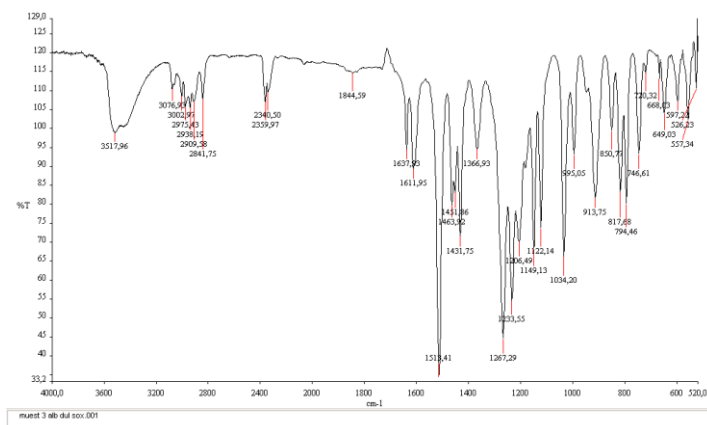
Destilación por arrastre de vapor



Destilación directa

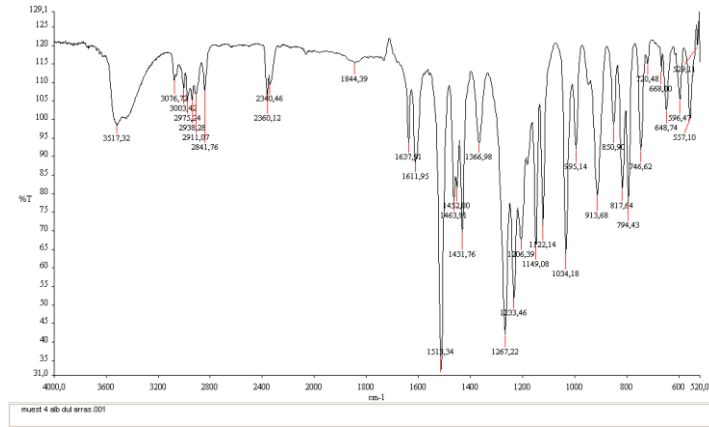


Soxhlet

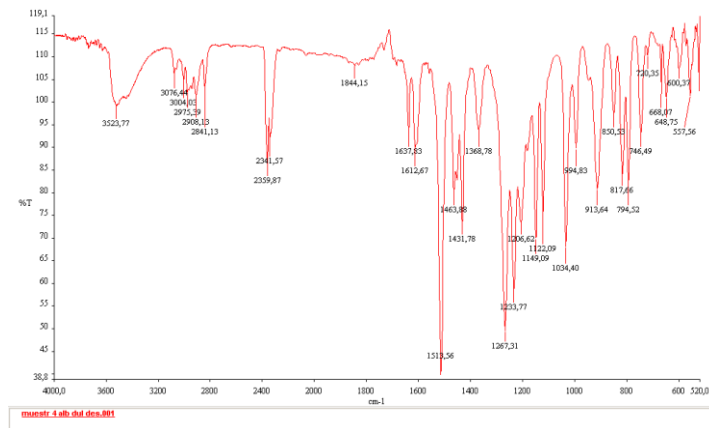


ALBAHACA DE DULCE MUESTRA 4

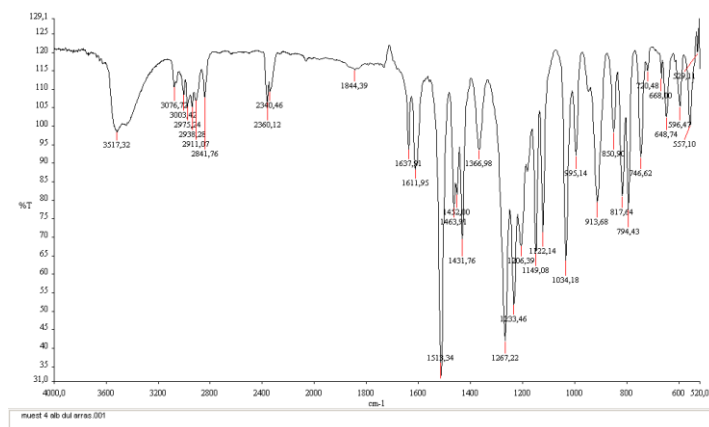
Destilación por arrastre de vapor



Destilación directa

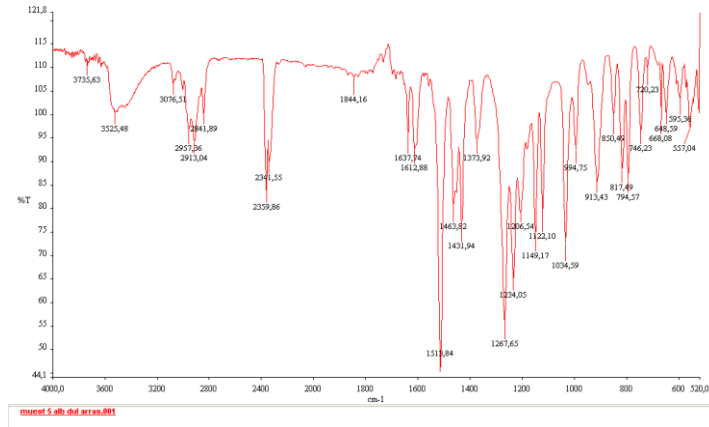


Soxhlet

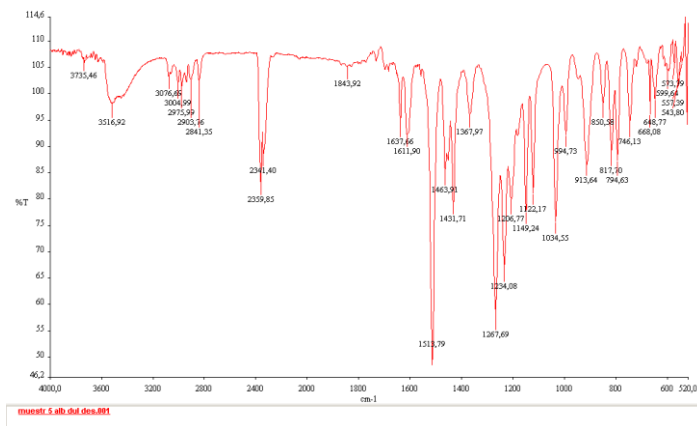


ALBAHACA DE DULCE MUESTRA5

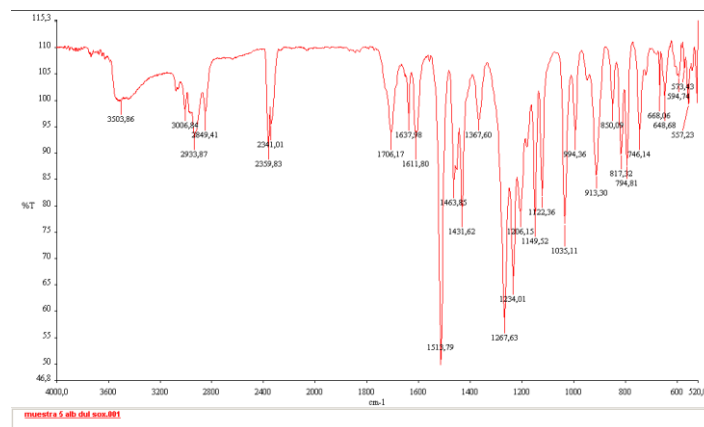
Destilación por arrastre de vapor



Destilación directa

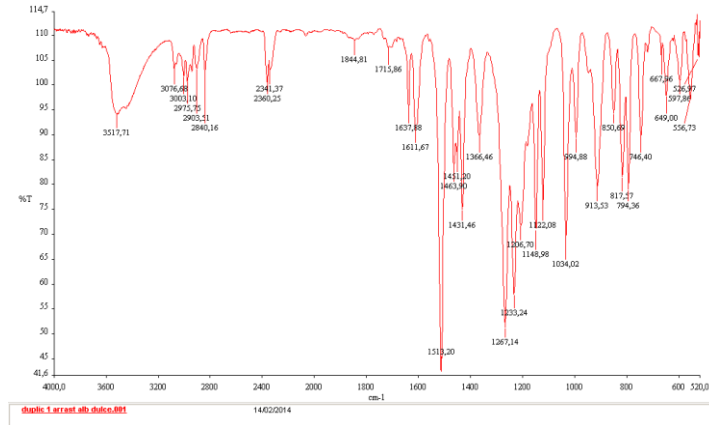


Soxhlet

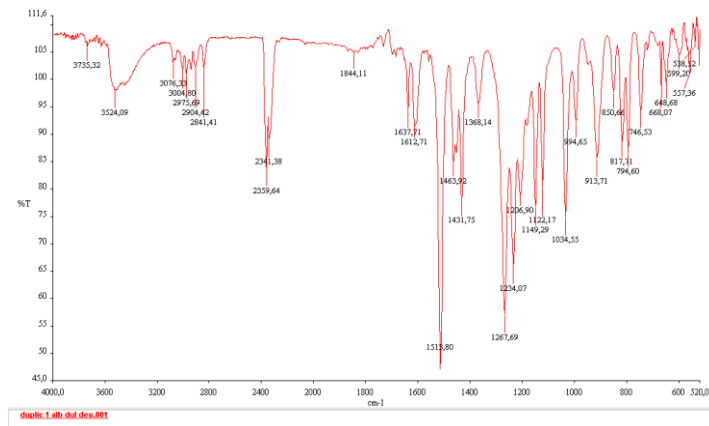


ALBAHACA DE DULCE DUPLICADO 1

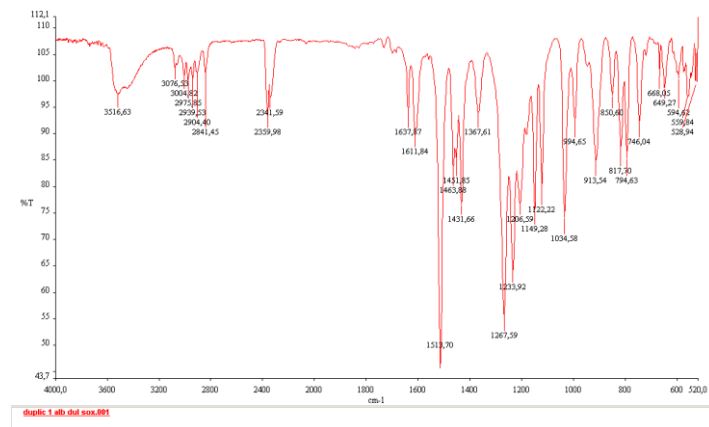
Destilación por arrastre de vapor



Destilación directa

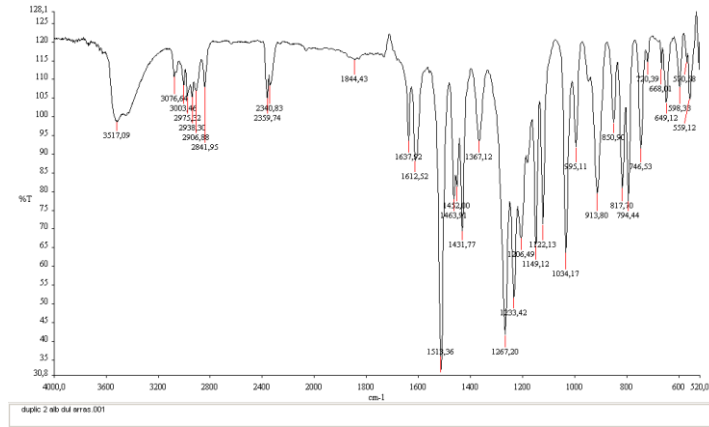


Soxhlet

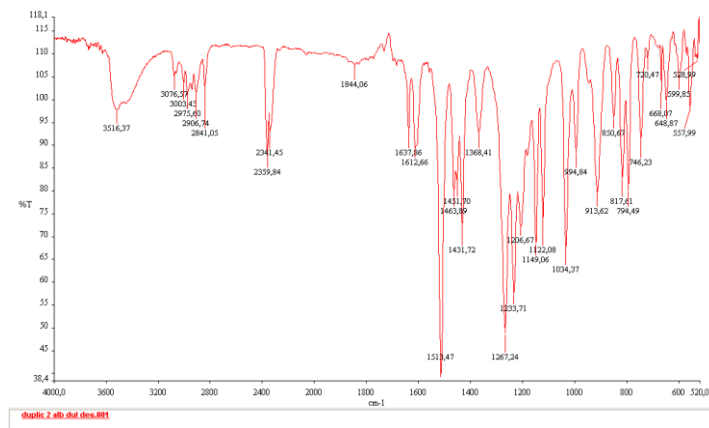


ALBAHACA DE DULCE DUPLICADO 2

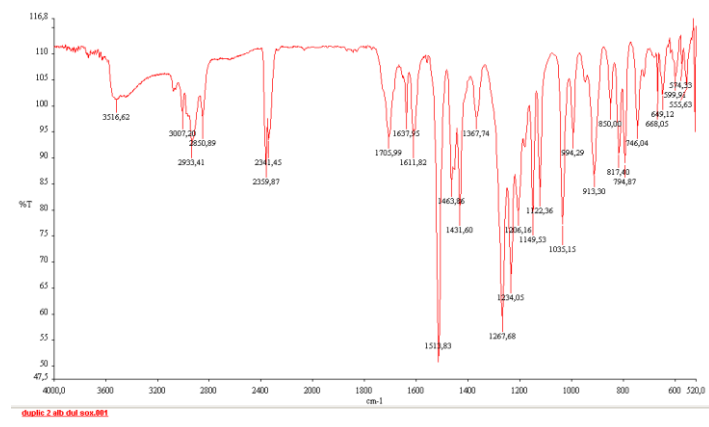
Destilación por arrastre de vapor



Destilación directa

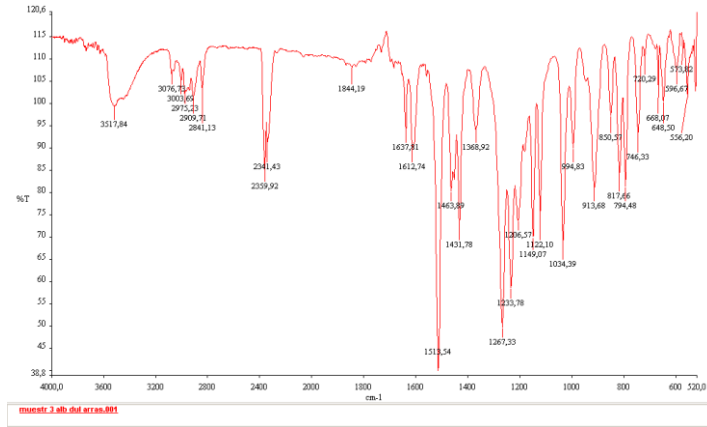


Soxhlet

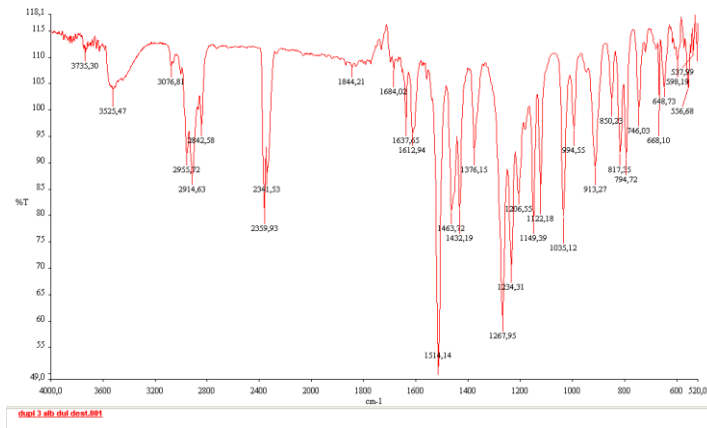


ALBAHACA DE DULCE DUPLICADO 3

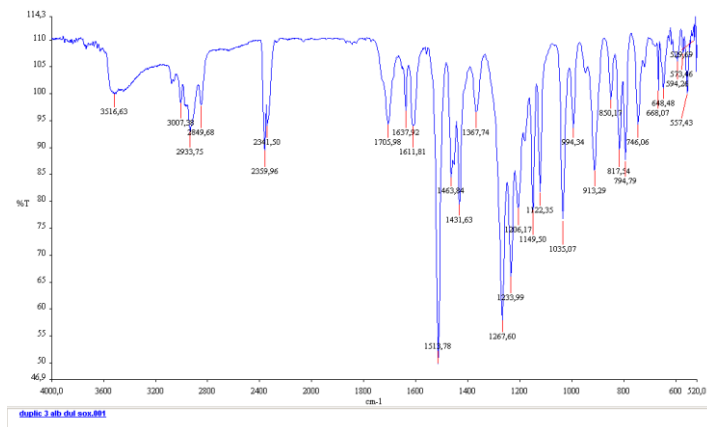
Destilación por arrastre de vapor



Destilación directa

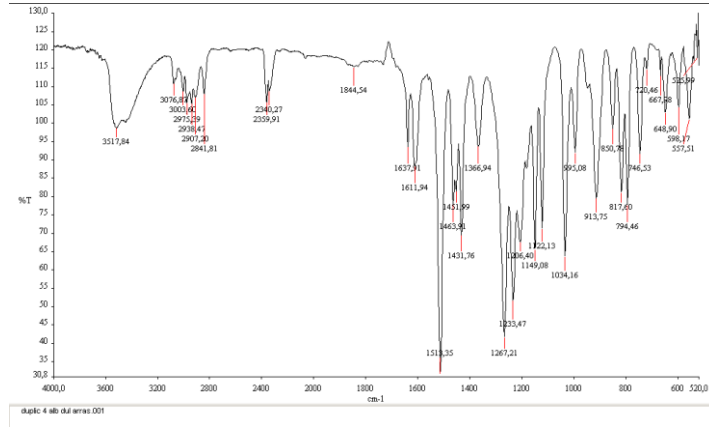


Soxhlet

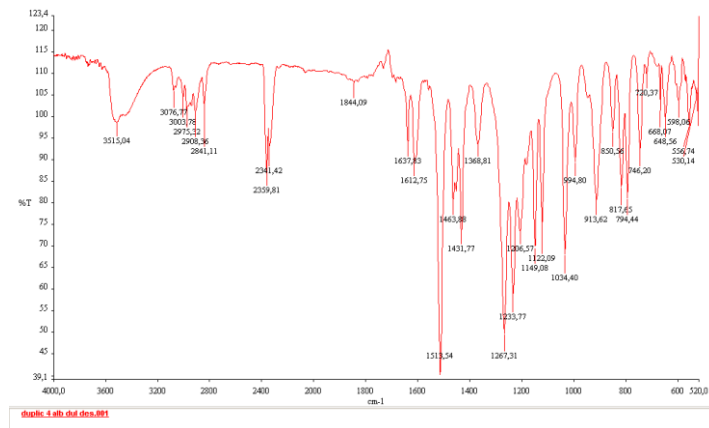


ALBAHACA DE DULCE DUPLICADO 4

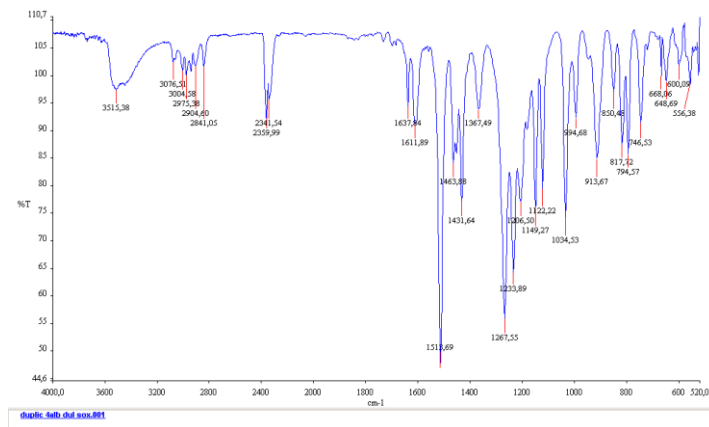
Destilación por arrastre de vapor



Destilación directa

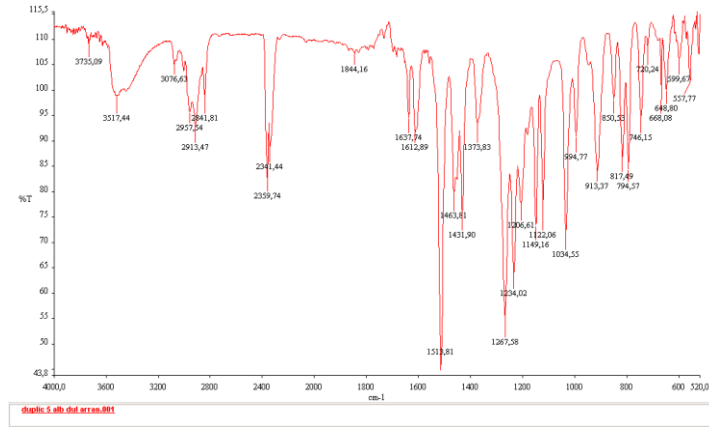


Soxhlet

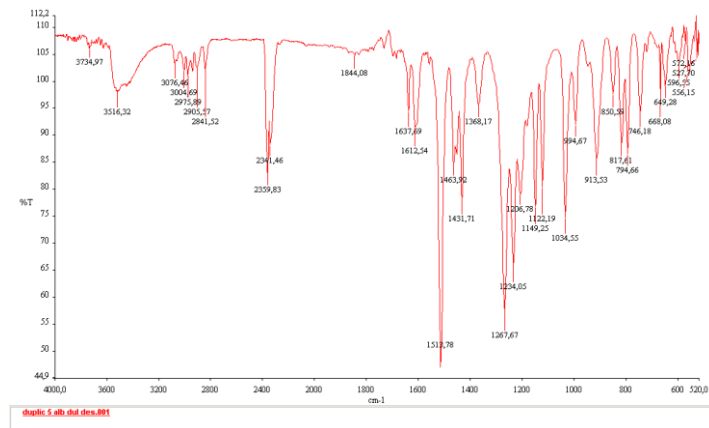


ALBAHACA DE DULCE DUPLICADO 5

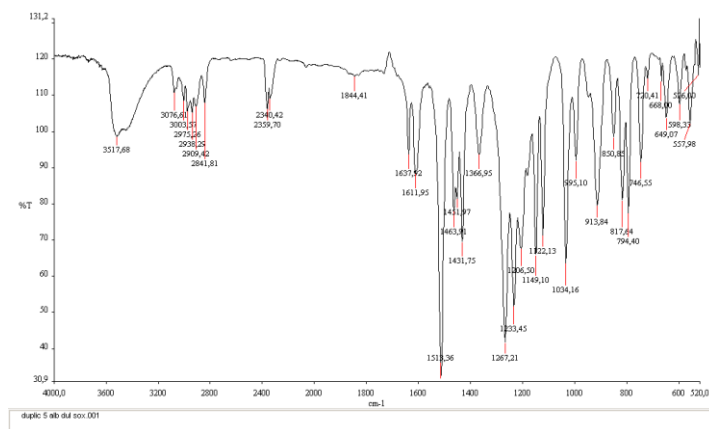
Destilación por arrastre de vapor



Destilación directa



Soxhlet



DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Juan Francisco Almeida Ludeña, C.I. 171872216-6 autor del trabajo de graduación titulado: "Aislamiento y caracterización experimental y computacional de eugenol en Albahaca de sal (*Ocimum basilicum*) y Albahaca de dulce (*Ocimum americanum*)", previa a la obtención del grado académico de **LICENCIADO EN CIENCIAS QUÍMICAS CON MENCIÓN EN QUÍMICA ANALÍTICA** en la Facultad de **Ciencias Exactas y Naturales**:

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 21 de noviembre de 2014

Sr. Juan Francisco Almeida

171872216-6