



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

TITULACIÓN DE INGENIERÍO QUÍMICO

“Determinación de tocoferoles y tocotrienoles en cuatro especies de *Arecaceae* del sur del Ecuador mediante Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas”

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

Autora:

Jara Alvarado Diana Verónica

Tutora:

Solano Cueva Natalí Elizabeth, Ing.

Loja-Ecuador

2012

CERTIFICACIÓN

Ing. Natalí Elizabeth Solano Cueva, Docente-Investigador de la Universidad Técnica Particular de Loja,

CERTIFICO:

Que el presente trabajo: “Determinación de tocoferoles y tocotrienoles en cuatro especies de *Arecaceae* del Sur del Ecuador mediante Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas”, realizado por el profesional en formación: **Diana Verónica Jara Alvarado**, cumple con los requisitos establecidos en las normas generales para la Graduación en la Universidad Técnica Particular de Loja, tanto en el aspecto de forma como de contenido, por lo cual me permito autorizar su presentación para los fines pertinentes

Loja, 2012

Ing. Natalí Elizabeth Solano Cueva
TUTORA DEL PROYECTO
CI:1104083884

CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Diana Verónica Jara Alvarado, declaro ser autora del presente trabajo y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Artículo 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja; en su parte pertinente, dice textualmente: “Forman parte del Patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

Loja, 2012

Diana Verónica Jara Alvarado
PROFESIONAL EN FORMACIÓN
CI. 1900559806

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo de investigación a mis padres y hermanos, como muestra de amor que les tengo y como deseo que perduremos muchos años más como la hermosa familia que siempre hemos sido.

Diana

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer primero a Dios que me ha dado paciencia y sabiduría en estos años.

A mis padres por todo su amor y consejos.

A la Ing. Yadira Ordóñez por haberme dado la oportunidad de trabajar con ella en este proyecto.

Al Ing. Vladimir Morocho por ayudarme en la parte Botánica de este investigación.

A la Ing. Natalí Solano por haber continuado conmigo este proyecto, por sus consejos, paciencia y además de ser amiga.

A la Ing. Paola Ordóñez, Ing. Juan Carlos Romero, Omar Malagón Ph.D. por haberme ayudado de manera desinteresada.

Al Dr. César Compadre quien es el mentor de este tema de investigación y nos ha colaborado de todas las maneras posibles.

A mis hermanos por todo el amor que me dan.

A mis amigos por estar conmigo en los buenos y malos momentos.

Diana

CONTENIDO

CERTIFICACIÓN.....	I
CESIÓN DE DERECHOS.....	II
DECICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTO.....	IV
CONTENIDO.....	V
RESUMEN E JECUTIVO.....	XI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 <i>Arecaceae</i>	2
1.1.1 Aspectos botánicos de las especies de la familia <i>Arecaceae</i>	2
1.2 Vitamina E, Tocoferoles y Tocotrienoles.....	6
1.3 Técnicas empleadas para la determinación de tocoferoles y tocotrienoles.....	10
2. OBJETIVOS DE LA TESIS.....	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
3.1 Recolección de materia vegetal y base de datos para almacenamiento de información Botánica y Etnobotánica.....	15
3.3 Procedimientos experimentales generales.....	18
3.4 Obtención del aceite y determinación de rendimientos.....	18
3.5 Determinación de propiedades físicas.....	20
3.6 Determinación de tocoferoles y tocotrienoles.....	22
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
4.1 Información Etnobotánica.....	27
4.2 Almacenamiento de información Botánica y Etnobotánica.....	27
4.3 Rendimientos y propiedades físicas.....	28
4.4 Determinación de tocoferoles y tocotrienoles.....	30
5. CONCLUSIONES.....	40

6. RECOMENDACIONES.....	42
7. BIBLIOGRAFÍA.....	43
8. ANEXOS.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

FIG 1. Estructuras moleculares de los Tocoferoles	7
FIG 2. Estructuras moleculares de los Tocotrienoles	7
FIG 3. Mecanismo de formación de tocoferoles	8
FIG 4. Mecanismo de formación de tocotrienoles	9
FIG 5. Esquema de partes de un Cromatógrafo de Gases	13
FIG 6. Esquema de un Espectrómetro de Masas con cuádrupolo	13
FIG 7. Lugar de recolección de la especie <i>Mauritia flexuosa</i>	16
FIG 8. Lugar de recolección de la especie <i>Prestoea acuminata</i>	16
FIG 9. Lugar de recolección de la especie <i>Veitchia merrilli</i>	17
FIG 10. Lugar de recolección de la especie <i>Wettinia maynensis</i>	17
FIG 11. Cromatograma de la especie <i>Veitchia merrilli</i>	32
FIG 12. Espectro de masa de α -tocoferol en la especie <i>Veitchia merrilli</i>	33
FIG 13. Fragmentos de la molécula α -Tocoferol	34
FIG 14. Cromatograma de la especie <i>Mauritia flexuosa</i>	34
FIG 15. Espectro de masa de β o γ -tocoferol en la especie <i>Mauritia flexuosa</i>	35
FIG 16. Fragmentos de las moléculas β - γ -tocoferol	36
FIG 17. Espectro de masa de α -tocoferol en la especie <i>Mauritia flexuosa</i>	37
FIG 18. Fragmentos de la molécula α -Tocoferol	38

ÍNDICE DE CUADROS Y GRÁFICAS

CUADRO 1. Propiedades físicas de dos especies de <i>Arecaceae</i> consideradas en este estudio.	28
GRÁFICO 1. Comparación de rendimientos de las 4 especies en estudio por método Soxhlet	29
GRÁFICO 2. Comparación de datos de rendimiento de 4 especies de <i>Arecaceae</i> por método de maceración.	30
CUADRO 2. Pesos moleculares de los tocoles.	31
CUADRO 3. Iones de referencia de los tocoles.	32

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA 1. Especie <i>Mauritia flexuosa</i>	3
FOTOGRAFÍA 2. Especie <i>Prestoea acuminata</i>	4
FOTOGRAFÍA 3. Especie <i>Veitchia merrilli</i>	5
FOTOGRAFÍA 4. Especie <i>Weittinia maynensis</i>	6
FOTOGRAFÍA 5. Equipo de extracción Soxhlet	19
FOTOGRAFÍA 6. Rotaevaporador	19
FOTOGRAFÍA 7. Envase y etiquetado de los aceites	19
FOTOGRAFÍA 8. Extracción de aceites por maceración	20
FOTOGRAFÍA 9. Balanza-picnómetro	21
FOTOGRAFÍA 10. Refractómetro	21
FOTOGRAFÍA 11. Saponificación de un aceite usando una atmósfera inerte	23
FOTOGRAFÍA 12. Cromatografía de Capa Fina	23
FOTOGRAFÍA 13. Viales	24
FOTOGRAFÍA 14. Derivatizante	24
FOTOGRAFÍA 15. Baño seco	24
FOTOGRAFÍA 16. Cromatógrafo de Gases acoplado a un Espectrofotómetro de Masas	25
FOTOGRAFÍA 17. Imagen de base de datos.	28
FOTOGRAFÍA 18. Placa TLC realizada para determinar una reacción de un aceite antes y después de ser saponificado.	31

ABREVIATURAS

CG	Cromatografía de Gases.
EM	Espectrometría de Masas
TLC	Cromatografía de Capa Fina
α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
γ	Gama
α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
γ	Gama
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
Rf	Factor de retención

RESUMEN

La vitamina E es un componente esencial para el organismo que no puede faltar en la dieta diaria, ésta se encuentra presente principalmente en aceites vegetales. De aquí la importancia de estudiar cualitativamente las especies de *Arecaceae* del Sur del Ecuador específicamente de las provincias de Loja y Zamora Chinchipe. Se recolectaron 4 especies diferentes, de las cuales se extrajo el aceite vegetal de la fruta de las palmeras tanto del mesocarpio como del endocarpio por separado, por el método Soxhlet.

Se calcularon sus rendimientos y se elaboró una base de datos en la cual consta la información Botánica y Etnobotánica de cada una de las especies estudiadas. Se procedió a establecer el método para inyectar las muestras en el Cromatógrafo de Gases acoplado a un Espectrofotómetro de Masas, determinándose que era necesario saponificar las muestras y posteriormente derivatizarlas para ser inyectadas. Se logró identificar la presencia de α -tocoferol en la especie *Veitchia merrilli*, β o γ -tocoferol y α -tocoferol en la especie *Mauritia flexuosa*.

ABSTRACT

Vitamin E is an essential component of the body, you can't lack in the diet daily, it is present in vegetable oils. Here the importance of study qualitatively the species of Arecaceae of Southern Ecuador specifically in the provinces of Loja and Zamora Chinchipe. Four species were collected and extracted their vegetable oil from the fruit of the palm trees, mesocarp and the endocarp were distilled separately using the Soxhlet method.

The yields of extraction were calculated and elaborated a database which contains Botanical and Ethnobotany information of each species recollected. The method of injection samples into the GC-MS was established and the vegetable oils have to be saponify. Finally it was determined the presence of tocopherols in some of the palm species collected. It was possible to determine the presence, α -tocopherol - *Veitchia merrilli* the species, and β or γ -tocopherol, α -tocopherol in the species *Mauritia flexuosa*.

1. INTRODUCCIÓN

Las palmas son uno de los elementos más conspicuos en muchos tipos de vegetación tropical y subtropical (Balick 1983, Henderson et al.1995). Además de su importancia ecológica en estos ecosistemas, su llamativa presencia y alta diversidad, muchas especies son utilizadas en forma regular e intensiva por el hombre, constituyendo elementos integrales de su cultura y economía (Narel Y. Paniagua-Zambrana, 2005).

Ecuador tiene una gran variedad de climas lo que lo hace muy rico en lo que a materia vegetal se refiere (Borgtoft, Balslev, 1993), existiendo muchas familias de plantas que únicamente han recibido estudio botánico.

La familia de las *Arecaceae* (palmeras), son plantas con flores monocotiledóneas, que se pueden desarrollar en una gran variedad de climas. Existen aproximadamente 33 géneros conocidos, actualmente con alrededor de 127 especies y 15 especies endémicas de *Arecaceae* en el Ecuador (Jørgensen, León, 1999).

En nuestro país las palmeras fueron usadas por siglos por los indígenas, ayudándoles a suplir sus necesidades diarias como: alimentación, vivienda, herramientas, bebidas, medicina, etc. Debido a sus muchas facetas útiles, las palmeras silvestres constituyen un importante recurso para el desarrollo agrícola sostenible. La riqueza de los productos provenientes de las palmeras es en parte un reflejo del alto número de especies que crecen en el Ecuador (Borgtoft, Balslev, 1993).

En las provincias de Loja y Zamora Chinchipe ubicadas al sur del Ecuador habitan muchas especies de palmeras de las cuales no existe evidencia de estudios fitoquímicos previos, siendo éstas una fuente natural de vitamina E (Dewick P. 2001).

La vitamina E tiene una función antioxidante, mediante la cual protege a los tejidos de los efectos nocivos de las toxinas ambientales y del daño consecuente a los procesos metabólicos normales, contribuyendo a prevenir el envejecimiento de células, tejidos y algunas formas de cáncer (Watson, Preedy, 2009).

Es por razones como ésta que nos vemos en la necesidad de realizar este trabajo de investigación, ya que no se encontraron estudios previos de estas especies recolectadas en las bases de datos consultadas tales como: ISI Web of Knowledge, International Food Policy Research y Wolters Kluwer Health.

1.1 *Arecaceae*

Las *Arecaceae* también conocidas como palmeras se encuentran ampliamente distribuidas en la región tropical a nivel mundial, con algunas especies que se extienden en zonas subtropicales en ambos hemisferios, desarrollándose en casi todo tipo de hábitat, desde selvas tropicales hasta desiertos. La mayoría de las palmeras se distinguen por sus grandes hojas compuestas, pinnadas en la parte superior y sus elevados tallos ramificados (Finn, Morales, 2006).

En todo el mundo la familia de las palmeras tiene aproximadamente 2800 especies en 200 géneros, de las cuales 837 especies en 81 géneros están en América del Sur (Borgtoft, Balslev 1993). Además, de ser un grupo diverso y ecológicamente importante, los componentes de la familia *Arecaceae* tienen renombre por su extraordinaria utilidad para las comunidades humanas, y se encuentran siendo explotadas en amplios rangos de escalas económicas a nivel mundial (Finn y Morales., 2006).

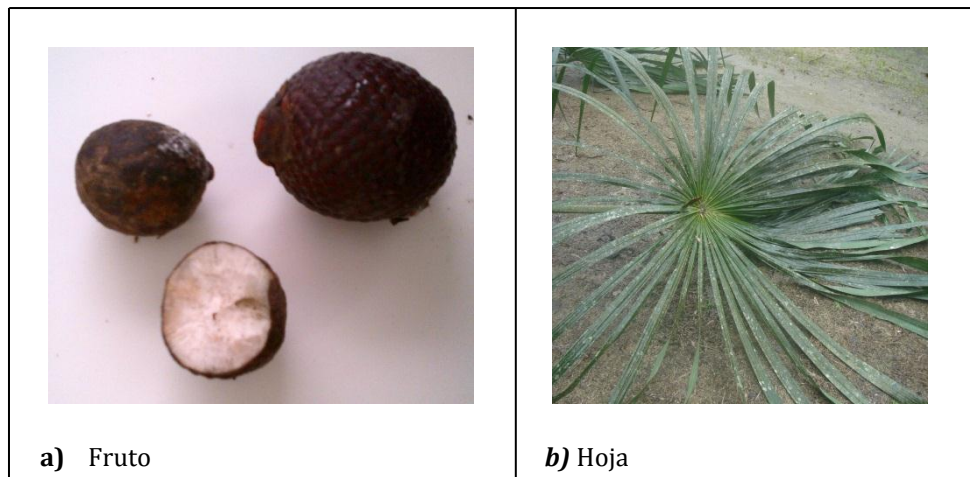
A continuación se realiza una descripción de las especies que son consideradas dentro del presente trabajo de investigación.

1.1.1 Aspectos botánicos de las especies de la familia *Arecaceae*

➤ *Mauritia flexuosa*

Familia: *Arecaceae*

Nombre científico: *Mauritia flexuosa*



Fotografía 1. Especie *Mauritia flexuosa*
Fuente: La autora

Descripción:

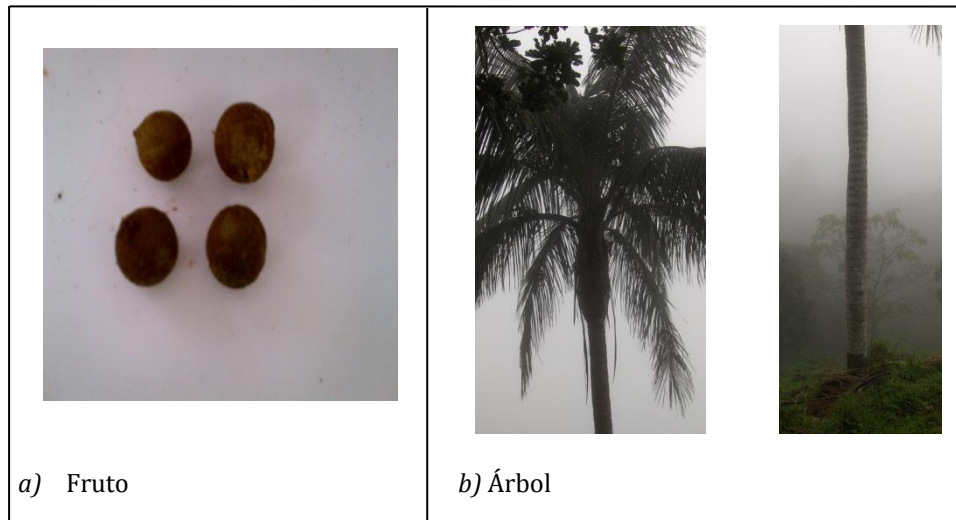
Está distribuida en todo el norte de América del Sur, al este de los Andes, donde frecuentemente forma grandes poblaciones en suelos pantanosos y ácidos. Esta palma proporciona muchos productos incluyendo frutos comestibles y oleaginosos, fibras de sus hojas, almidón y sabia de su tronco. Sus frutos están recubiertos de escamas, no tienen espinas. Poseen flores pistiladas sostenidas individualmente o en pequeñísimas ramas, son estaminadas y están en pares. En Ecuador es conocida como Achu, Aguaschi, Canangucha, Kanango'cho, Morete, Ne'e' (Borgtoft, Balslev 1993).

Es una palma solitaria de gran altura, con un tronco que supera los 40 m de alto y un diámetro de altura al pecho (dap) de 30 a 60 cm. Sus troncos son limpios y cuando jóvenes tienen nudos conspicuos (Borgtoft, Balslev 1993).

➤ *Prestoea acuminata*

Familia: Arecaceae

Nombre científico: *Prestoea acuminata*



Fotografía 2. Especie *Prestoea acuminata*
Fuente: La autora

Descripción:

El género *Prestoea* se encuentra distribuido en un área que va desde Centro América hasta Bolivia a lo largo de los Andes. Es un género monocotiledóneo, ampliamente usado como fuente para palmito. En el Ecuador *P. acuminata* es cosechada en poblaciones naturales de bosque montañoso entre 1.000-2.000 m en grandes cantidades por industrias enlatadoras (Palm & Cycad Societies of Australia, 2012).

Esta palma tiene hojas pinnadas a 8 m de altura, puede crecer solitario o retoños. Tiene un tronco verde, anillos blancos de hasta 25 cm de diámetro. Las hojas de color verde oscuro son de tamaño medio, 2,0-2,5 m de largo (Palm & Cycad Societies of Australia, 2012).

➤ *Veitchia merrilli*

Familia: Arecaceae

Nombre científico: *Veitchia merrilli*



Fotografía 3. Especie *Veitchia merrilli*
Fuente: La autora

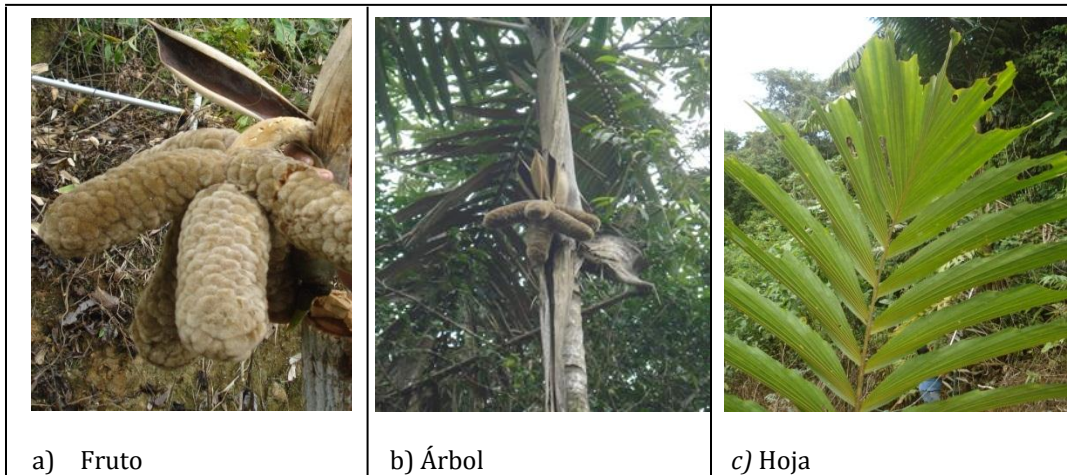
Descripción:

Especie inducida, nativa de Filipinas, ésta es una pequeña y bonita palmera muy cultivada en los jardines tropicales. Alcanza 6 m de alto al madurar y tiene un tronco esbelto marcado con anillos. Sus hojas son plumosas, de color verde vivo, brotan de una roseta apical corta y forman una copa compacta. Posee brillantes frutos rojos, de 35 mm de largo, que cuelgan en racimos bajos en otoño e invierno. Esta especie suele verse plantada al abrigo de edificaciones para que el viento no dañe sus delicadas frondes (Burnie *et. al*, 2006).

➤ ***Wettinia maynensis***

Familia: Arecaceae

Nombre científico: *Wettinia maynensis*



Fotografía 4. Especie *Weittinia maynensis*
Fuente: La autora

Descripción:

Son plantas solitarias, que crecen en las laderas orientales de los Andes y adyacentes a tierras bajas, premontaña y bosque mesófilo de la montaña del Amazonas (Colombia, Ecuador y Perú), a 200-1600 m de altitud. Alcanza los 6-14 m de alto, y 8-15 cm de diámetro, posee de 3-9 inflorescencias en cada nodo; sus frutos tienen forma prismática dipiramidal, redondeada en elápice, con una medida de 1,8-2,5 cm de largo y 1,5-2 cm de diámetro, cubierta de pelos blancos, con un endospermo homogéneo. Los tallos son utilizados como postes en la construcción (Henderson, et. al, 1995).

1.2 Vitamina E, Tocoferoles y Tocotrienoles

Los aceites vegetales son compuestos orgánicos obtenidos a partir de semillas u otras partes de las plantas en cuyos tejidos se acumula como fuente de energía. El aceite vegetal se puede obtener mecánica (prensado) o químicamente (disolvente hexano), y generalmente se usa alguna combinación de ambas técnicas (Murray, et al. 2010).

Vitamina E, es un término genético que incluye todas las entidades que exhiben una actividad natural biológica de D- α tocoferol. En la naturaleza se encuentran ocho sustancias en la vitamina E, pero que difieren en el sitio de metilación y en el sitio de saturación de la cadena, y que tienen actividad como componentes de la vitamina E: α -, β -, γ - y δ -tocoferol (Fig.1) y α -, β -, γ - y δ -

tocotrienol (Fig. 2). Los tocoferoles contienen una saturación en el sitio fitilo de la cadena. Y los α , β , γ y δ -tocotrienol tienen tres dobles enlaces en la cadena (Preedy, Watson, 2007).

Su estructura consta de dos partes primarias, un anillo complejo cromano, con un hidroxilo (6- hidroxicromano) y una larga cadena lateral de 16 carbonos constituidas por la unión de tres unidades de isopreno saturado (Preedy, Watson, 2007).

Los tocoferoles son los componentes más abundantes de los aceites vegetales y naturales, el α -tocoferol es el tocoferol principal, y los δ , γ , β son compuestos que se encuentran presentes en cantidades menores, mientras que los tocotrienoles son los componentes más activos, el isómero más abundante es el γ -tocotrienol (Preedy, Watson, 2007).

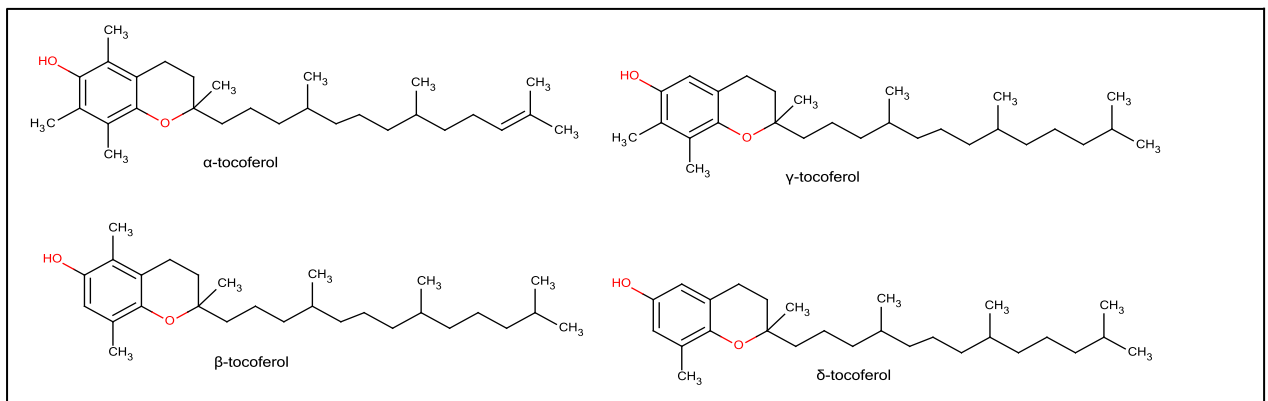


Fig 1. Estructuras moleculares de los Tocoferoles
Fuente: Watson, Preedy, 2009.

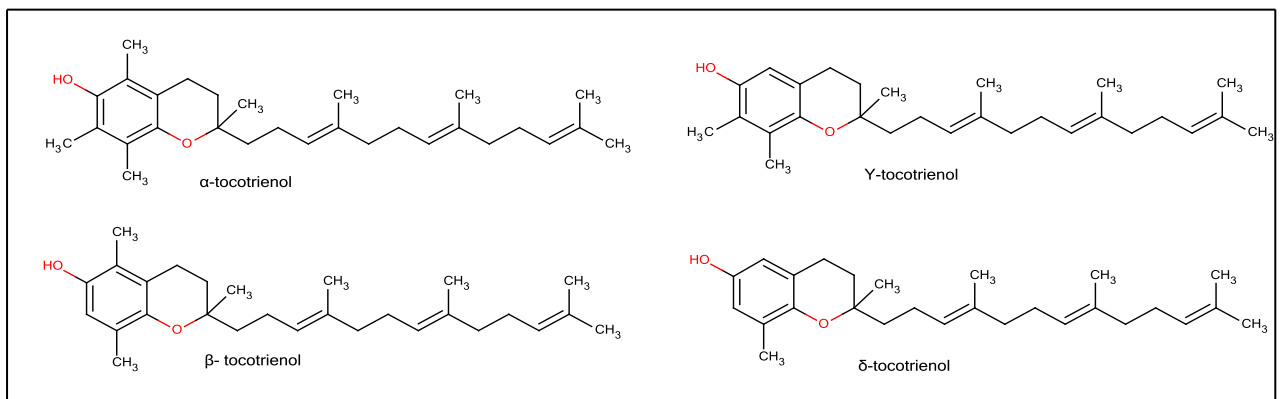


Fig 2. Estructuras moleculares de los Tocotrienoles
Fuente: Watson, Preedy, 2009.

En las figuras 3 y 4 se muestran los mecanismos de formación de los tocoferoles y tocotrienoles, respectivamente.

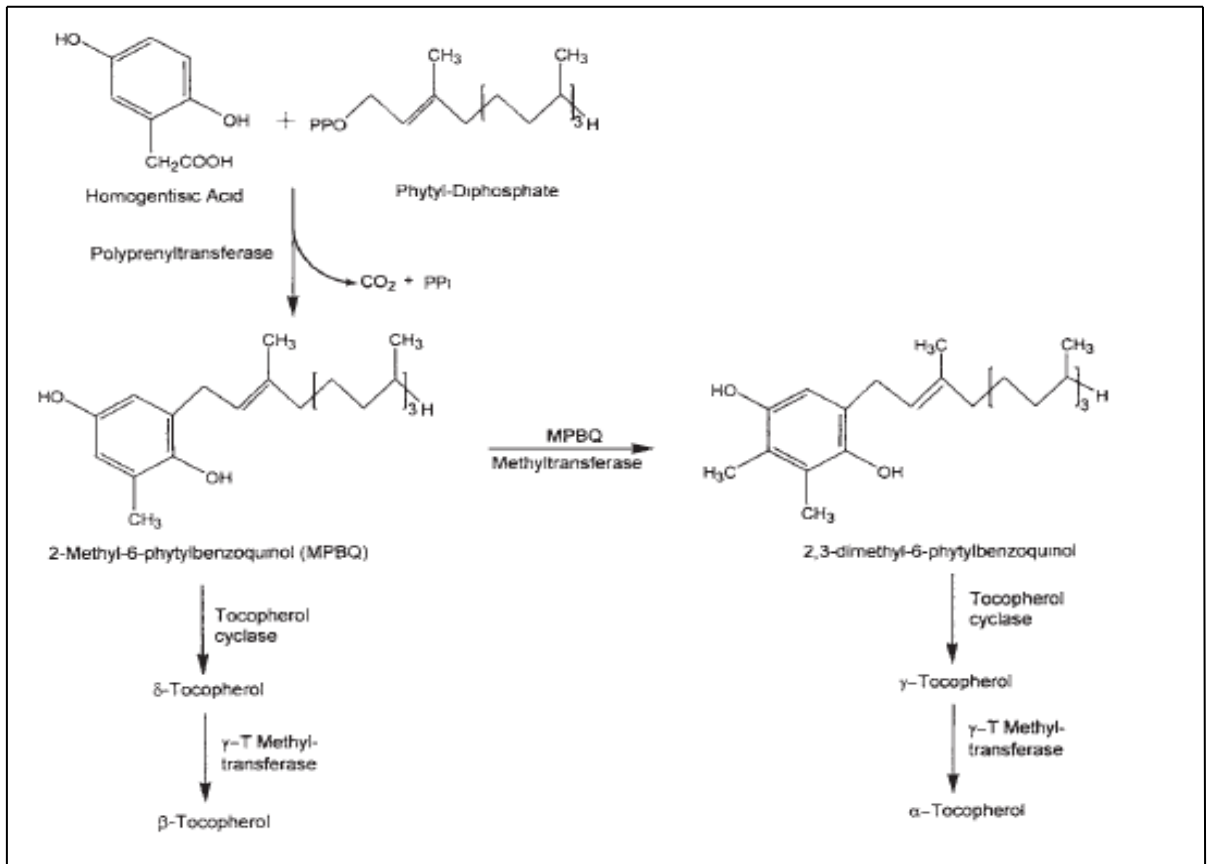


Fig 3. Mecanismo de formación de tocoferoles
Fuente: Eitenmiller, Lee, 2004

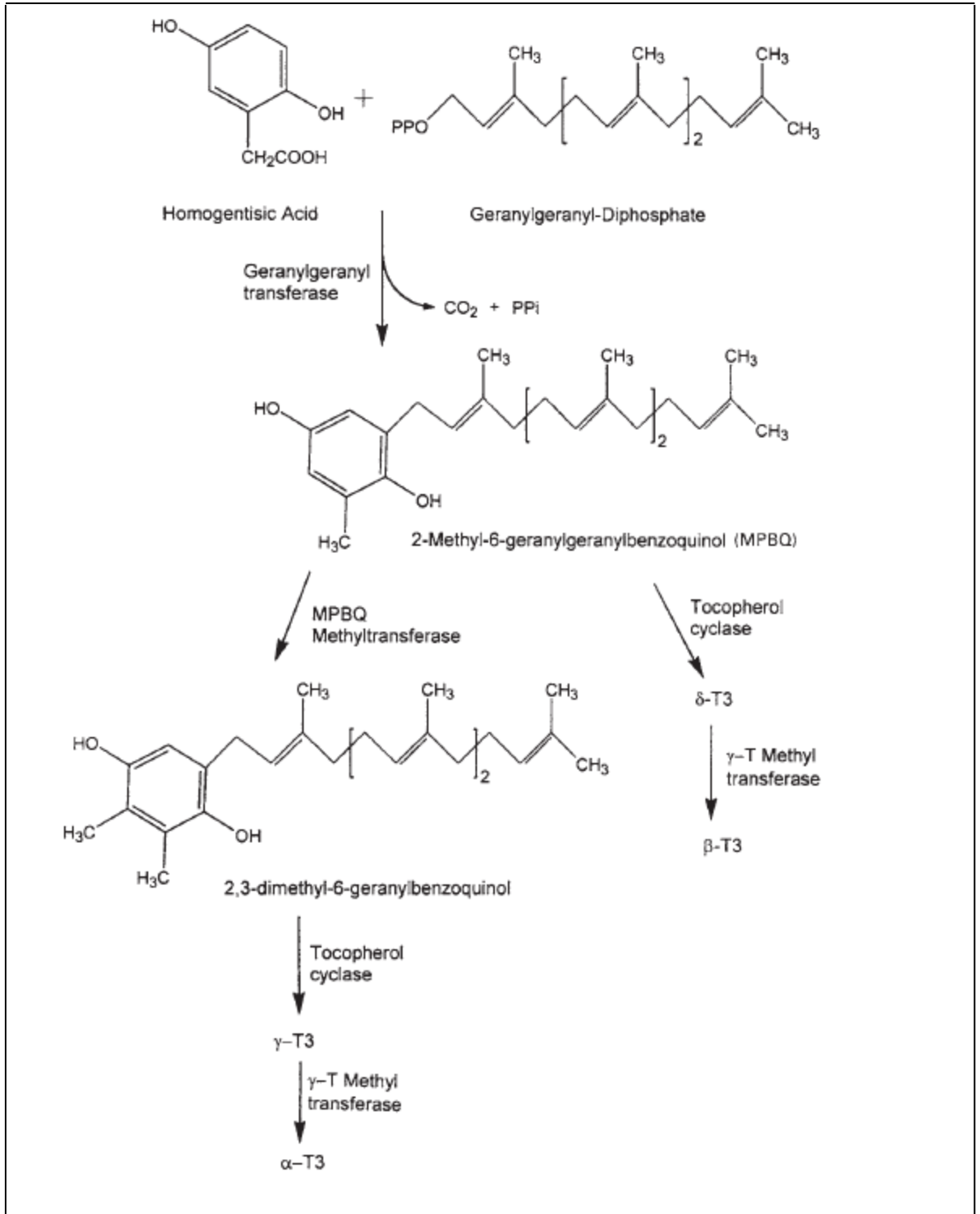


Fig 4. Mecanismo de formación de tocotrienoles
Fuente: Eitenmiller, Lee, 2004

Estos compuestos no son sintetizados por el organismo humano por lo que deben ser suministrados en la dieta diaria. La vitamina E tiene diversas funciones metabólicas.

Entre ellas tal vez el más importante y mejor estudiado es el papel protector de las membranas biológicas, ya sea evitando la oxidación de sus componentes celulares esenciales o evitando la formación de productos tóxicos de oxidación como los peróxidos de ácidos grasos no saturados, actuando así como estabilizador de la estructura lipídica de los tejidos (Bravo *et. al*, 1976).

1.3 Técnicas empleadas para la determinación de tocoferoles y tocotrienoles

✓ Saponificación

Los aceites son componentes de origen vegetal, que están constituidos de ésteres de propanotriol, glicerol o glicerina y ácidos grasos, a los que se les conoce como triglicéridos. Cada aceite natural contiene diversos triglicéridos y eventualmente algún otro lípido, aunque corrientemente en baja proporción. Los triglicéridos en estado líquido a la temperatura ambiental se denominan aceites. Cuando a las mismas condiciones el estado físico es sólido se conocen como grasas, mantecas o sebos. Todas las sustancias grasas sean de origen vegetal o animal, están constituidas en un elevado porcentaje, por ácidos grasos, combinados con glicerina (glicéridos). Los ácidos grasos constituyen el 94% a 96% del peso total de las moléculas que conforman el aceite. Los aceites obtenidos de las frutas frescas o de las cáscaras de frutas, tales como el aceite de palma, aceite de oliva, contienen como principales componentes ácidos, el palmítico, oleico y el linoleico . Las células grasas, contienen también otros lípidos en pequeñas cantidades, llamados insaponificables, es decir que no pueden ser hidrolizados en ácidos grasos (Trejo, Maury, 2002).

Una de las reacciones químicas más importantes de los ésteres es la saponificación, que consiste en la combinación de un éster con una base inorgánica para dar una sal orgánica y un alcohol (Chang, College, 2005).

La determinación de la materia insaponificable sirve para determinar la pureza de un aceite y para su valoración. Incluye los componentes insapoficables extraíbles

con determinados solventes lipofílicos, tales como esteroides, hidrocarburos, alcoholes; etc (Herrera, 2007).

Se denomina fracción insaponificable a la suma de aquellos componentes de un aceite que se pesan como residuo volátil después de la saponificación a partir de una disolución acuosa alcalina tras la extracción con éter etílico o éter de petróleo (Herrera, 2007).

Las grasas se saponifican con hidróxido de potasio metanólico y los insaponificables se extraen con éter (Herrera, 2007).

✓ **Derivatización**

La derivatización es un proceso de alteración química de un compuesto, mediante la modificación de la funcionalidad de una molécula para aumentar o disminuir la volatilidad, los reactivos derivatizantes permiten a los cromatógrafos analizar compuestos que de otro modo no son fácilmente detectables. La derivatización también reduce la adsorción en el analito en el sistema de CG, mejora la respuesta del detector en la separación y simetría del pico (Sigma-Aldrich, 1997).

Los derivatizantes se utilizan por las razones siguientes:

- Para mejorar la resolución y reducir la simetría de compuestos polares (-OH, -COOH, =NH, -NH₂, -SH, y otros grupos funcionales).
- Para analizar compuestos relativamente no volátiles.
- Para mejorar la eficiencia analítica y aumenta la detección.
- Para mejorar la estabilidad de los compuestos (Sigma-Aldrich, 1997).

La elección de un reactivo de derivatizante se basa en el grupo funcional que requiere ser derivatizado, la presencia de otro grupo funcional en la molécula, y la razón para realizar la derivatización. La estructura química y propiedades de la molécula influyen en la elección del reactivo (Sigma-Aldrich, 1997).

La elección de un reactivo de derivatización, debe ser guiada por los siguientes criterios:

- Produzca una reacción de derivatización que es completa en un 95-100%.
- No cause ningún reordenamiento o alteración estructural durante la formación del derivado.
- No contribuya a la pérdida de la muestra durante la reacción.
- Produzca un derivado que no interactúe con la columna (CG).
- Produzca un derivado que es estable con respecto al tiempo (Sigma-Aldrich, 1997).

Se pueden usar derivatizantes como: Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide, que es el reactivo usado en esta investigación y fue seleccionado en la etapa preliminar de éste proyecto que consistió en la validación del método de inyección en el CG-EM. El derivatizante sustituye el H del grupo OH de la molécula ubicado en el grupo fenilo.

✓ **Cromatografía de Gases**

“Es un método usado para separar componentes orgánicos e inorgánicos de un analito, los cuales son distribuidos entre dos fases, de las cuales una es estacionaria y la otra es móvil. En Cromatografía de Gases se hace pasar el analito en forma gaseosa a través de la columna, arrastrado por una fase móvil gaseosa, llamada gas portador. La muestra de un líquido volátil o de un gas se inyecta, a través de un septo, en el que se evapora rápidamente. El vapor es arrastrado a través de la columna por el gas portador, que puede ser He, N₂ o H₂, y los analitos después de separados llegan al detector, cuya respuesta aparece en la pantalla de un ordenador. La columna debe estar suficientemente caliente a fin de que los analitos alcancen una presión de vapor suficiente para que se eluyan en un tiempo razonable. El detector se mantiene a una temperatura más alta que la columna, de forma que los analitos se encuentran en forma gaseosa” (Harris, 2001) En la Fig. 5 se muestra un esquema representativo de las partes de un Cromatógrafo de Gases.

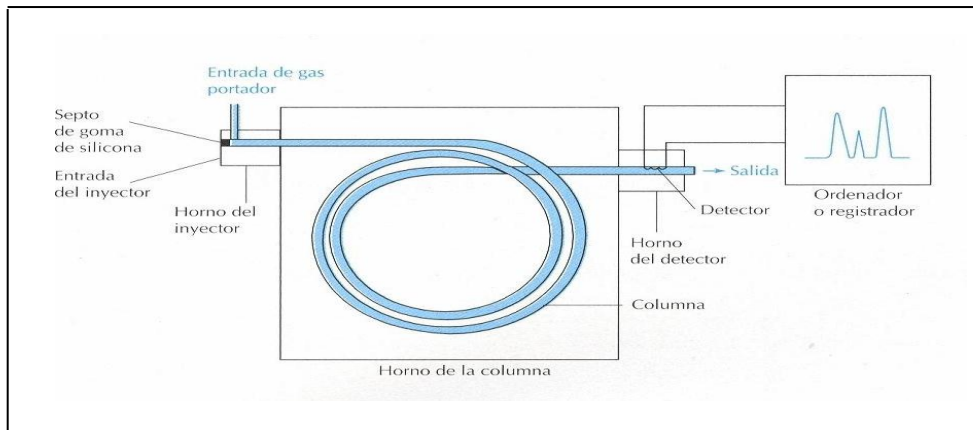


Fig 5. Esquema de partes de un Cromatógrafo de Gases
Fuente: Harris, 2001

✓ **Espectrometría de Masas**

La Espectrometría de Masas es una técnica analítica que separa los iones que se desplazan rápidamente según su relación masa/carga (Skoog *et al.*, 2001).

El proceso de ionización suministra suficiente energía para que las moléculas se rompan en diversos fragmentos. Un espectro de masas es un gráfico que muestra la abundancia relativa de cada fragmento que choca con el detector de un Espectrómetro de Masas. En la Fig. 6 se muestra un Espectrómetro de Masas con todos sus partes debidamente identificadas.

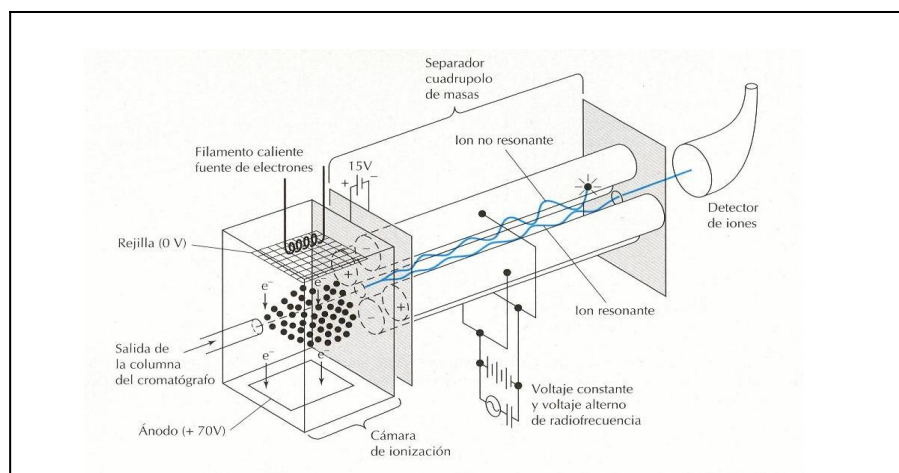


Fig 6. Esquema de un Espectrómetro de Masas con cuadrupolo
Fuente: Harris, 2001

2. OBJETIVOS DE LA TESIS

General:

- Determinar la presencia de tocoferoles y tocotrienoles en cuatro especies de *Arecaceae* del Sur de Ecuador mediante CG/EM.

Específicos:

- Recolectar 4 especies de *Arecaceae* en las provincias de Loja y Zamora Chinchipe y elaborar muestras de herbario.
- Identificar cada una de las especies, extraer los aceites vegetales y determinar los respectivos rendimientos.
- Realizar una base de datos que contenga la información Botánica y Etnobotánica.
- Determinar las propiedades físicas de los aceites extraídos.
- Identificar la composición química mediante Cromatografía de Gases, acoplado a Espectrometría de Masas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Recolección de materia vegetal y base de datos para almacenamiento de información Botánica y Etnobotánica.

Se recolectaron 4 especies de *Arecaceae*, las muestras fueron tomadas de un sólo árbol y se realizó una salida de campo por cada especie.

Los nombres de cada planta fueron identificados posteriormente en el Herbario Reinaldo Espinosa. La información de recolección se muestran a continuación:

- La especie *Mauritia flexuosa* fue recolectada en el cantón Zamora de la provincia de Zamora Chinchipe, en las coordenadas: 9572041N; 735734E, el día 12 de junio del 2010. Se depositó en el Herbario del Departamento de Química con el código PPN-aa-008 (Fig. 7).
- La especie *Prestoea acuminata* fue recolectada en el cantón Paltas de la provincia de Loja, en las coordenadas: 640629N; 9565134E, el día 23 de julio del 2010. Se depositó una muestra de herbario en el Departamento de Química con el código PPN-aa-003 (Fig. 8).
- La especie *Veitchia merrilli* fue recolectada en el cantón Catamayo de la provincia de Loja, en las coordenadas: 9557689N; 683185E, el día 17 de enero del 2010. Se depositó una muestra en el Herbario del Departamento de Química y fue etiquetada con el código PPN-aa-002 (Fig. 9).
- La especie *Wettinia maynensis* fue recolectada en el cantón Zamora de la provincia de Zamora Chinchipe, en las coordenadas: 9552167N; 733148E, el día 17 de julio del 2010. Se depositó una muestra en el Herbario del Departamento de Química y fue etiquetada con el código PPN-aa-009 (Fig. 10).

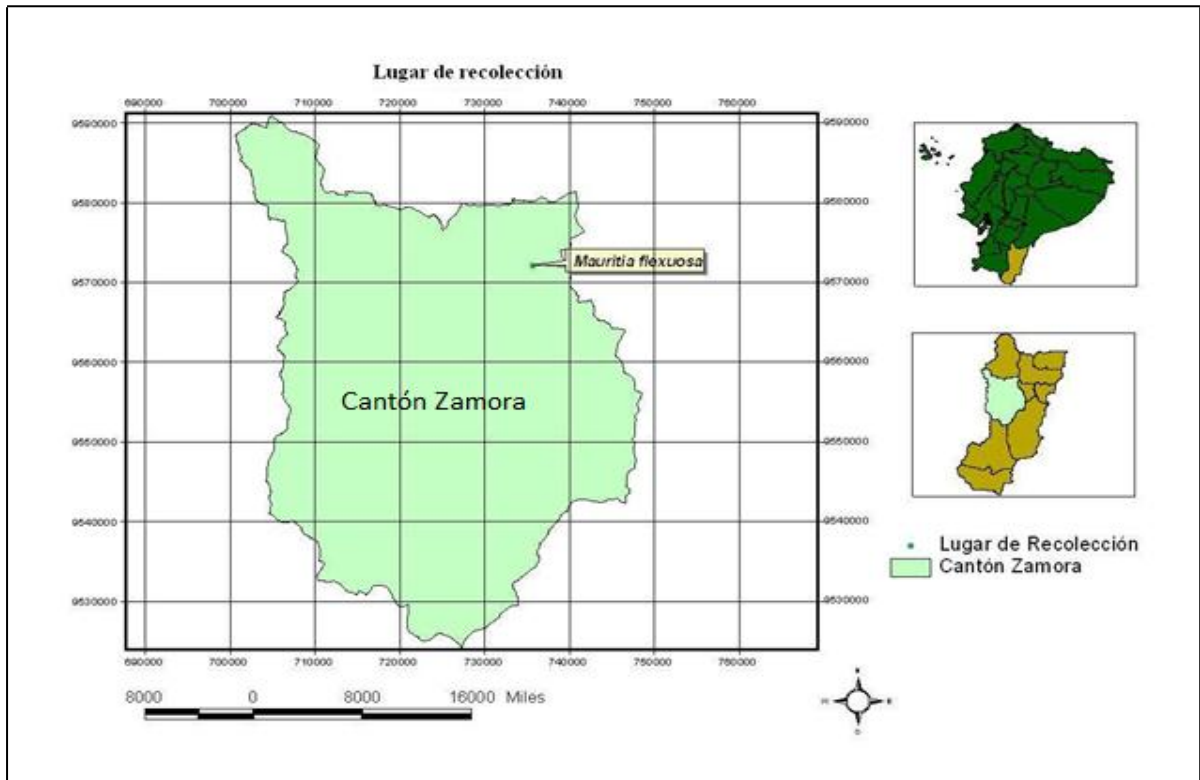


Fig 7. Lugar de recolección de la especie *Mauritia flexuosa*.
Fuente: La autora.

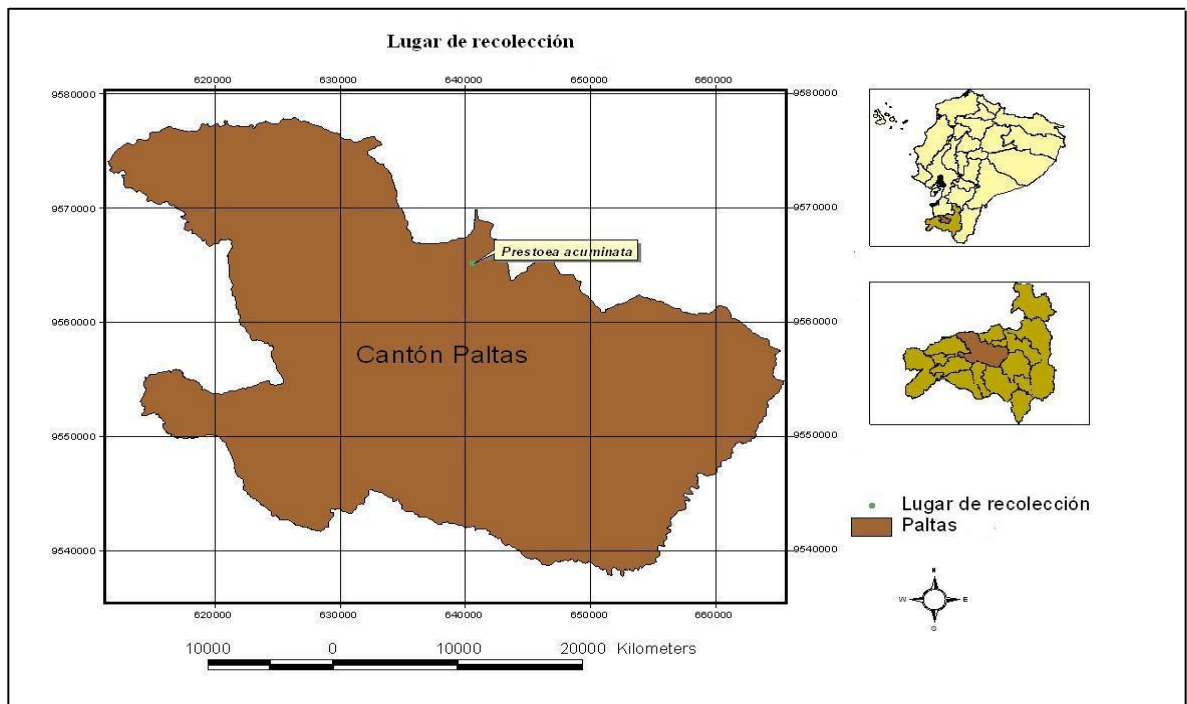


Fig 8. Lugar de recolección de la especie *Prestoea acuminata*
Fuente: La autora

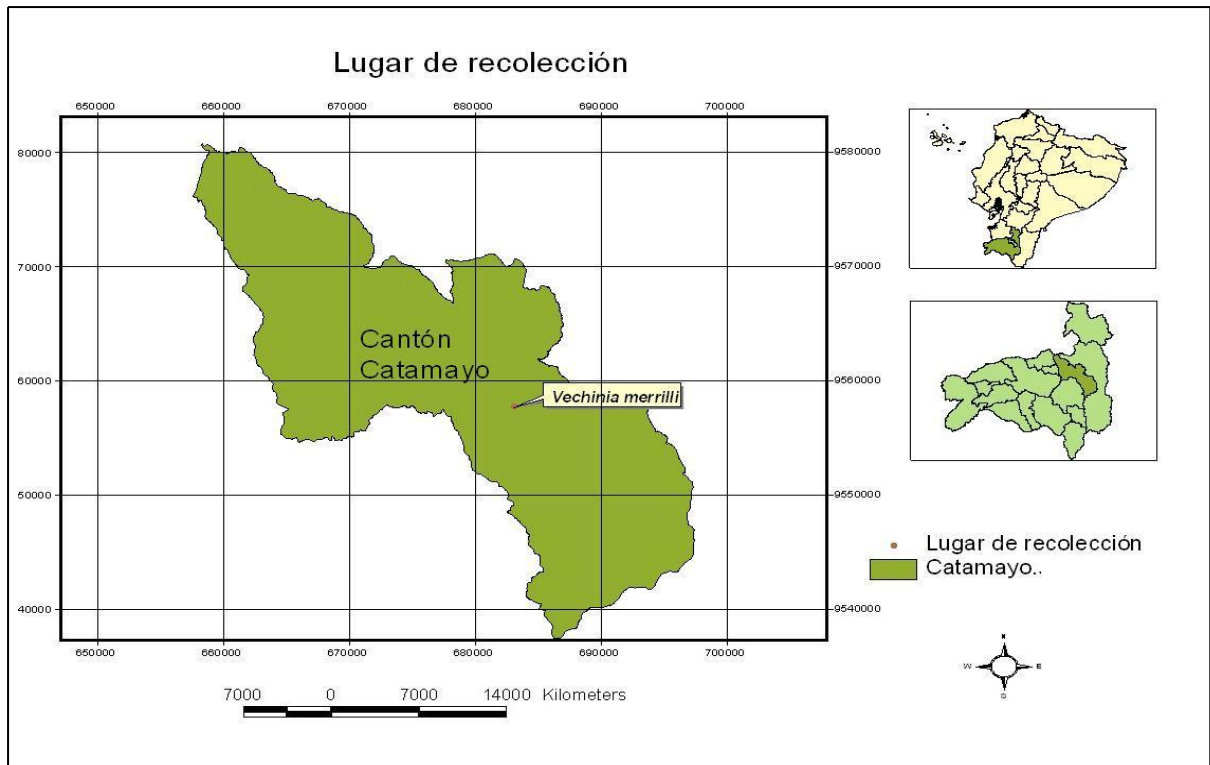


Fig 9. Lugar de recolección de la especie *Veitchia merrilli*.
Fuente: La autora.

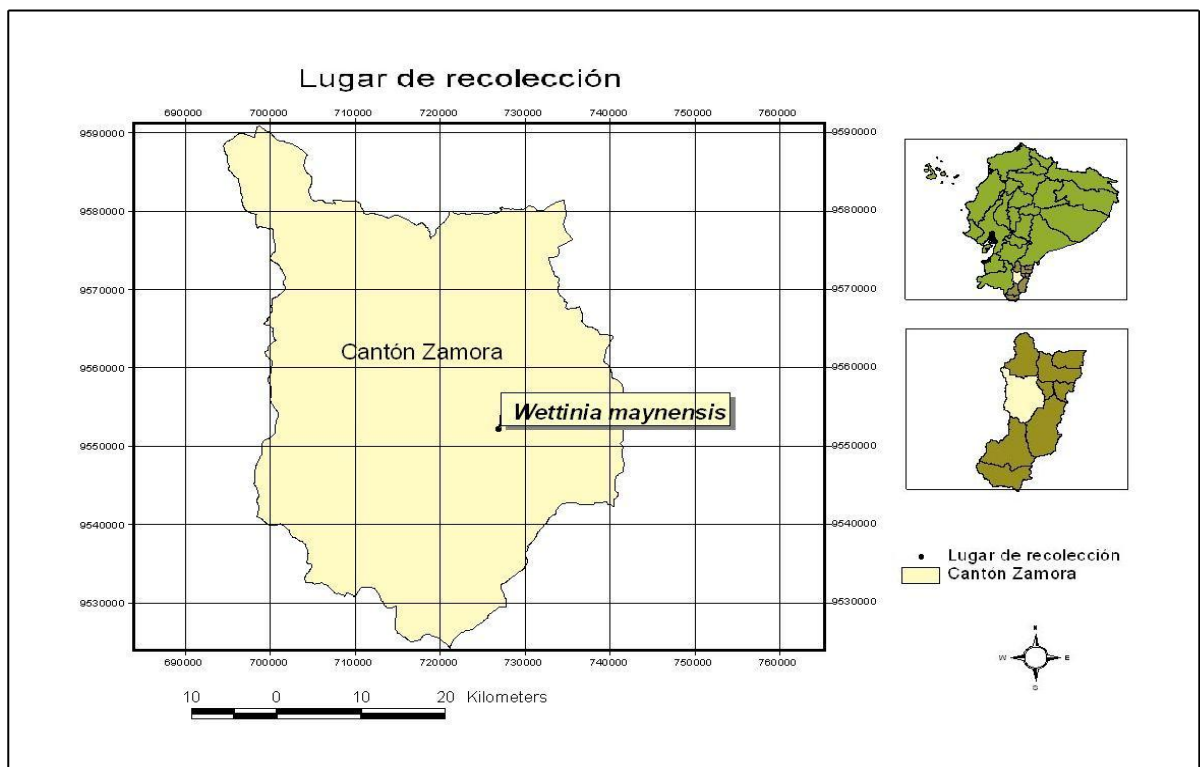


Fig 10. Lugar de recolección de la especie *Wettinia maynensis*.
Fuente: La autora.

Los frutos de palmera fueron separados de partes vegetales innecesarias y almacenados a una temperatura de $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta su uso posterior.

La información Etnobotánica fue obtenida mediante entrevista directa con personas nativas de los diferentes lugares donde fueron recolectadas las muestras.

Toda la información Botánica y Etnobotánica se almacenó en una base de datos elaborada en el programa Microsoft Access, versión Office Profesional Plus, año 2010, para lo cual la Universidad cuenta con una licencia de tipo educativa.

3.2 Procedimientos experimentales generales

La extracción de los aceites vegetales de las diferentes especies que se recolectaron, fue realizada mediante equipo Soxhlet, los tiempos de extracción y cantidad de solvente se determinaron previamente.

La identificación de los tocoferoles y tocotrienoles se realizó mediante Cromatografía de Gases (CG), el equipo usado fue de marca Agilent Technologies 6890N-Network CG System, serial US10347010, acoplado a Espectrometría de Masas (EM) MICROMASS, Quattro Ultima, serial VB226 de 50/60 Hz, operado bajo condiciones de impacto de electrones (IE) a 70eV. El método utilizado se detalla en el anexo I.

3.3 Obtención del aceite y determinación de rendimientos

El fruto de la palmera cuenta con dos partes útiles para la extracción de aceite que son: mesocarpio y endocarpio, que deben ser destiladas por separado (éstos una vez separados deben ser cortados en pedazos muy pequeños de tal manera que mejore el contacto entre la superficie de la muestra y el solvente. Para realizar los cortes respectivos se puede utilizar podadoras manuales).

Por cada 40 g de muestra, se añaden 200 ml de solvente (hexano). Éstos se colocaron en un equipo Soxhlet (Fotografía 5).



Fotografía 5. Equipo de extracción Soxhlet

Fuente: La autora

Se dejó destilar por 2 horas a una temperatura de 70 °C (se controló el tiempo desde que empieza a ebulir el hexano). Luego de transcurrido este tiempo se enfrió a temperatura ambiente y se concentró en un rotavapor a 25 °C (Fotografía 6).

Una vez que se haya constatado que ya no existe presencia de hexano en la muestra, se midió la cantidad de aceite obtenido en una probeta, o en los casos en que obtuvo aceite sólido se pesó en una balanza analítica. Se colocó los aceites en frascos color ámbar (Fotografía 7), se etiquetaron y guardaron en refrigeración a una temperatura de -4 °C (Amaral, 2005).



Fotografía 6. Rotavapor

Fuente: La autora



Fotografía 7. Envase y etiquetado de los aceites

Fuente: La autora

Se realizaron 3 extracciones con cada muestra con el fin de obtener la cantidad suficiente de aceite para los análisis posteriores.

Como método comparativo en la extracción de aceites, se obtuvo aceites vegetales por el método de maceración para lo cual se procedió de la siguiente manera:

Se trituró la materia vegetal por separado (mesocarpio y endocarpio), se pesaron 100 g de muestra y se añadió 400 ml de solvente (hexano). Se colocó en agitación dinámica por 24 horas a 3000 rpm y a temperatura ambiente, se repite esta acción 3 veces con la misma muestra (Fotografía 8).



Fotografía 8. Extracción de aceites por maceración dinámica
Fuente: La autora

Los rendimientos se obtuvieron en la herramienta virtual Microsoft Excel, versión Office Profesional Plus, año 2010, para lo cual la Universidad cuenta con una licencia de tipo educativa. En donde se introdujeron todos los datos obtenidos de las diferentes destilaciones usando la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Cantidad obtenida de aceite}}{\text{Cantidad de muestra inicial}} \times 100$$

3.4 Determinación de propiedades físicas

Se determinaron tres propiedades físicas:

- **Densidad:**

La densidad se define como la masa por unidad de volumen, que es igual al cociente entre la masa de un cuerpo (kg) y su volumen (m^3), sus unidades

dimensionales son kg/m^3 en el Sistema Internacional de Unidades, SI. (González, 2006).

La densidad fue determinada mediante la norma ANFOR NF T75-111 (ver anexo II), para lo cual se usó un termómetro, baño maría, picnómetro y balanza analítica (Fotografía 9).

Se realizaron tres repeticiones por cada muestra.

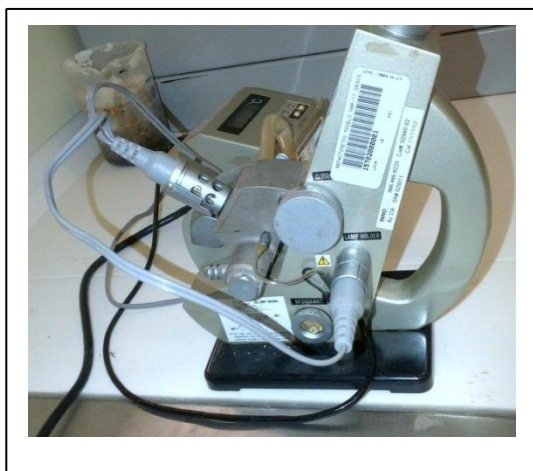


Fotografía 9.: Balanza- picnómetro

Fuente: La autora

- **Índice de refracción**

Esta propiedad fue medida usando un refractómetro marca ABBE (Fotografía 10.), que se encuentra en el Laboratorio de Alimentos-UTPL. Fue determinado mediante la norma ANFOR NF 75-112, (ver anexo III).



Fotografía 10. Refractómetro

Fuente: La autora

- **Color y apariencia**

La valoración se llevó a cabo usando el sentido de la vista, en éste apartado sólo se consideró los aceites en estado líquido debido a que en éstas muestras fue posible observar su consistencia, color, apariencia y características que nos permiten valorar la calidad del aceite utilizado.

3.5 Determinación de tocoferoles y tocotrienoles

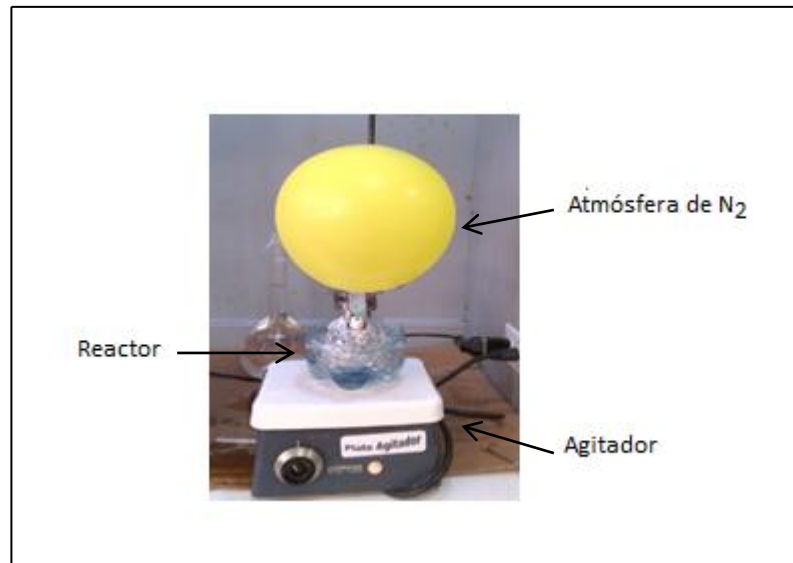
A continuación se detallan cada uno de los pasos que se realizaron durante la saponificación, derivatización e inyección de las muestras, hasta lograr finalmente la identificación de los compuestos de interés.

- **Saponificación de los aceites vegetales**

Para la determinación de tocoferoles y tocotrienoles en aceites vegetales fue necesario realizar la saponificación de las muestras (Instituto de la Grasa, 2000; Pocklington, Dieffenbacher 1988; Peterson M. *et. al*, 2006) (ver anexo IV).

Para saponificar las muestras es necesario crear una atmósfera inerte, debido a que los tocoles son muy sensibles al oxígeno.

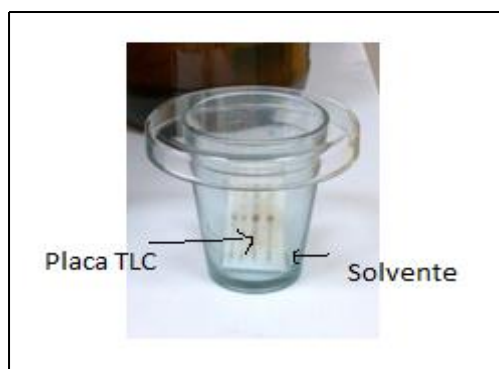
La atmósfera inerte se creó usando un globo de látex que fue llenado con nitrógeno y se colocó en la parte superior del balón de tres bocas que es considerado como reactor. Todo esto debió estar debidamente sellado teniendo una única salida para el aire que era desplazado por el nitrógeno dentro del reactor (Fotografía 11).



Fotografía 11. Saponificación de un aceite usando una atmósfera inerte
Fuente: La autora

Para verificar si la reacción de saponificación se llevó a cabo se realizó una Cromatografía de Capa Fina (TLC), usando como solventes una mezcla de hexano-acetato de etilo en proporciones 6:4 (Fotografía 12).

Para llegar a estas proporciones se partió de una relación hexano-acetato de etilo 1:1, estos valores fueron variando hasta que se obtuvo un R_f de 75 que es el más óptimo para este tipo de compuestos. Los solventes fueron seleccionados debido a su afinidad con los compuestos de interés. Se realizaron TLC necesarias hasta obtener los resultados deseados (Valcálcer, Gómez, 1988).



Fotografía 12. Cromatografía de Capa Fina
Fuente: La autora

- **Derivatización de las muestras saponificadas**

Se pesó 0,001 g de aceite de palma saponificado que fue colocado en un vial con inserto (Fotografía 13) y se agregó 100 μ l de derivatizante (N-methyl-N-TMS-trifluoroacetamide) (Fotografía 14).



Fotografía 13. Viales

Fuente: La autora



Fotografía 14. Derivatizante

Fuente: La autora

Se colocó en un baño seco marca Labnet (Fotografía 15), previamente calentado a 60 °C por un lapso de tiempo de 15 min. Se dejó enfriar en un desecador durante 15 min antes de ser inyectada en el CG/EM (Toyo'aka, 1999).



Fotografía 15. Baño seco

Fuente: La autora

- **Inyección de las muestras**

Finalmente se inyectó diferentes muestras en el CG/EM (Fotografía 16), usando el método que se detalla en el anexo I.



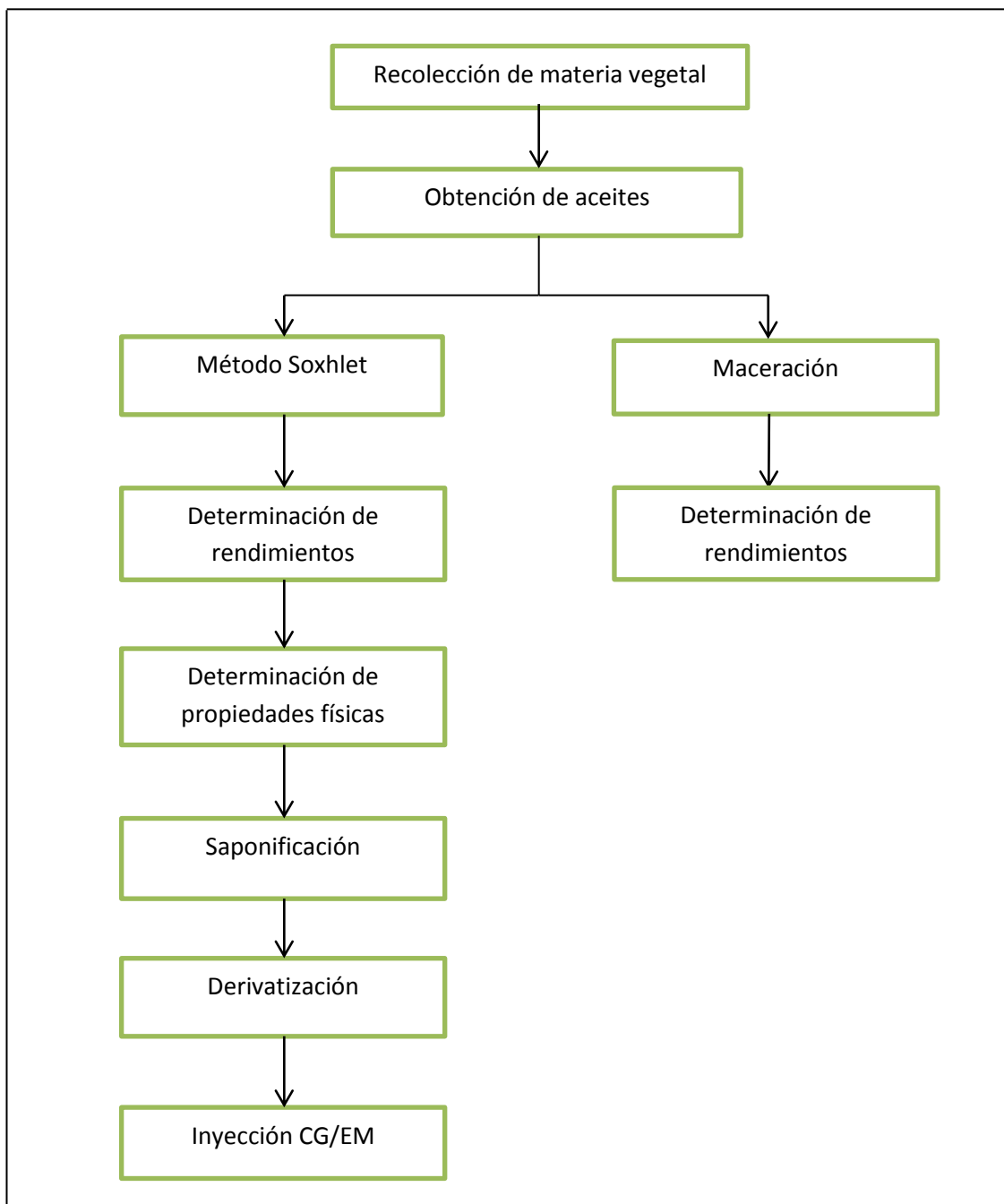
Fotografía 16. Cromatógrafo de Gases acoplado a un Espectrofotómetro de Masas

Fuente: La autora

Se inyectaron estándares de tocoferoles y tocotrienoles en CG/EM, que fueron derivatizados previamente y posteriormente nos sirvieron comparar los iones de referencia aquí obtenidos con los de las muestras.

Esquema general de procedimiento

En el siguiente esquema se mencionan cada una de las actividades realizadas en esta investigación hasta llegar a la determinación de tocoles mediante CG/EM.



Fuente: La autora

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN


4.1 Información Etnobotánica.

A continuación se describe la información Etnobotánica recolectada:

- La especie *Mauritia flexuosa*, se conoce con el nombre común de Acho. Es usada como alimento, su fruto es consumido en jugo o cocido.
- La especie *Prestoea acuminata*, se conoce con el nombre común de Palma. Es usada como alimento.
- La especie *Veitchia merrilli*, es conocida con el nombre común de Palmera. Tiene uso ornamental.
- La especie *Wettinia maynensis*, se conoce con el nombre común de Coco. Es usada para alimentar animales y para la construcción.

4.2 Almacenamiento de información Botánica y Etnobotánica

La información Etnobotánica fue proporcionada por las personas que habitan en los lugares donde se recolectó las muestras, y ésta fue almacenada en una base de datos que se elaboró en Microsoft Access, que adicionalmente contiene la información Botánica de cada especie y puede ser usada para almacenar información de investigaciones futuras. Esta base de datos reposa en un CD en el Laboratorio de Análisis Químico Instrumental del Departamento de Química. En la Fotografía 17 se muestra una imagen del formato usado.

ARECACEAE	
Id:	5
Nombre común:	Acho, Morete
Familia:	Areaceae
Género:	<i>Mauritia</i>
Especie:	<i>flexuosa</i>
Sinónimo:	<i>Mauritia vinifera</i> , <i>Mauritia minor</i>
Lugar de recolección:	Zamora, La Canzama
Coordenadas:	735734 E 9572041 N 889 m altura
Descripción:	Tronco de 6 m de altura, 40 cm de diámetro. Corona de muchos de hojas gigantes. Las inflorescencias originan entre las hojas inferiores, con una rama horizontal.
Usos:	Alimento (fruto cocido o en jugo)
código de herbario:	PPN-aa-008
Imagen:	
Rendimiento mesocarpio %:	1.916
Rendimiento coco %:	0.7

Fotografía 17. Imagen de base de datos.
Fuente: La autora

4.3 Rendimientos y propiedades físicas

a) Extracción de aceite vegetal mediante equipo Soxhlet

Las propiedades físicas de dos especies en estudio se muestran en el cuadro 1.

Nombre de la especie	Parte utilizada	Densidad	Índice de refracción	Color subjetivo	Apariencia
<i>Mauritia flexuosa</i>	mesocarpio	0,8883	1,4674	amarillo-translúcido	líquido-viscoso
<i>Veitchia merrilli</i>	mesocarpio	0,9095	1,45726	anaranjado-translúcido	líquido-viscoso

Cuadro 1. Propiedades físicas de dos especies de *Areaceae* consideradas en este estudio.

Fuente: La autora

El aceite vegetal extraído del endocarpio de las especies *Veitchia merrilli* y *Mauritia flexuosa* no fue tomado en cuenta para los ensayos posteriores debido a su bajo rendimiento, de ésta especie sólo se consideró el mesocarpio.

Las especies *Wettinia maynensis* y *Prestoea acuminata* fueron descartadas porque presentaron un rendimiento mínimo al momento de extraer los aceites. Además, se presentó la dificultad de realizar nuevas recolecciones para obtener más muestra

porque el tiempo de cosecha de las especies había terminado teniendo que esperar un año para nuevamente recolectar los diferentes especímenes.

En el gráfico 1 se muestra una comparación de los rendimientos obtenidos de los aceites y de cada una de sus partes en porcentaje. En el cual podemos evidenciar que la especie *Veitchia merrilli* y *Mauritia flexuosa* tienen un mayor porcentaje en rendimiento en comparación a las otras especies.

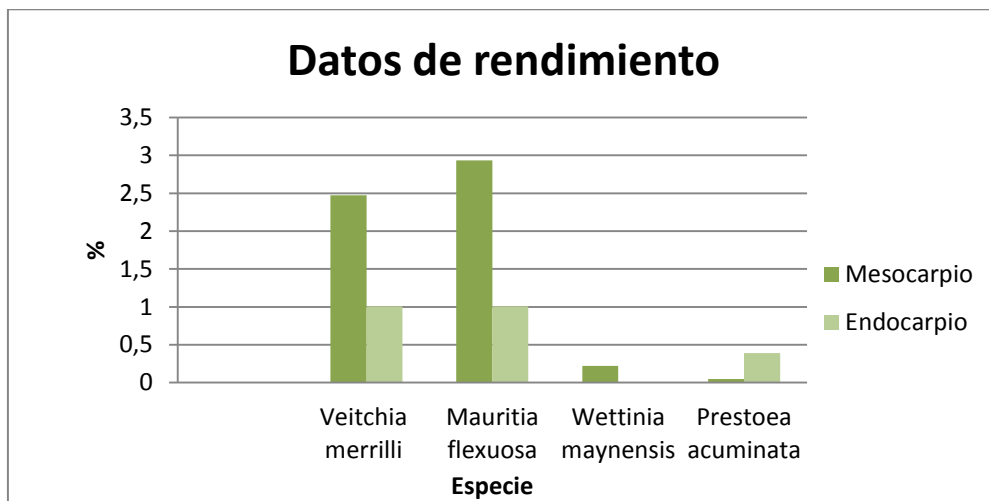


Gráfico 1. Comparación de rendimientos de las cuatro especies en estudio por método Soxhlet
Fuente: La autora.

b) Extracción de aceite vegetal por el método de maceración

Los resultados obtenidos de la extracción de aceite del mesocarpio y endocarpio se muestran en el gráfico 2. Se realizó una comparación entre los resultados obtenidos de la extracción de aceite de los frutos de las cuatro especies que se consideraron en este estudio por el método de maceración. En el cual, podemos observar que la especie *Mauritia flexuosa* presenta el mayor rendimiento en el endocarpio, mientras que la especie *Veitchia merrilli* presenta mayor porcentaje de extracción en el mesocarpio.

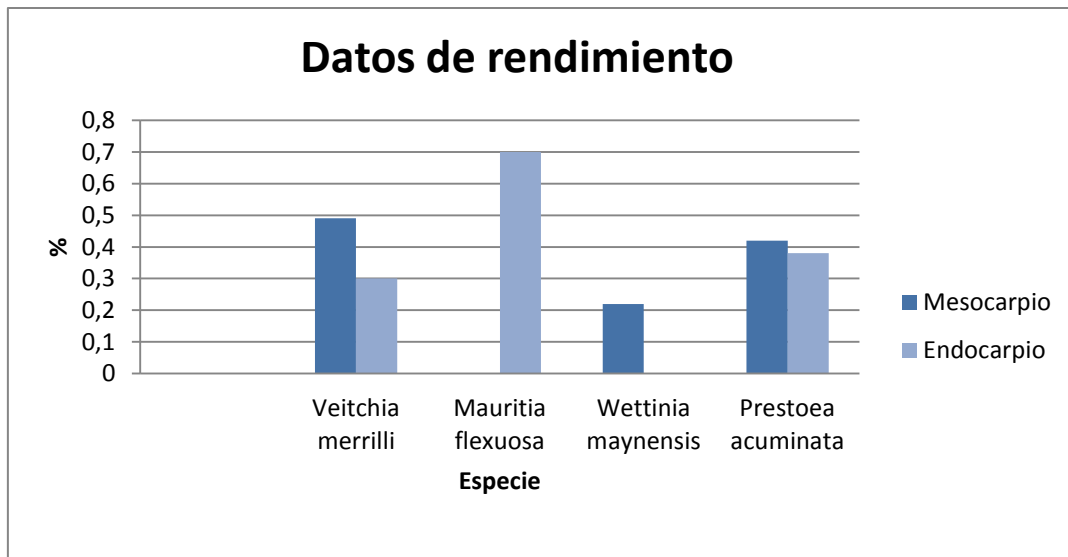


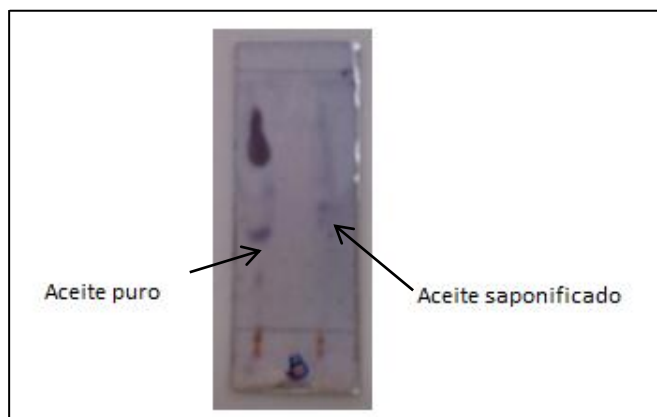
Gráfico 2. Comparación de datos de rendimiento de cuatro especies de *Areaceae* por método de maceración.
Fuente: La autora.

Se comparó los resultados obtenidos en las dos diferentes extracciones con otras investigaciones realizadas, tal es el caso del estudio que tiene por tema “*Extracción y caracterización del aceite de Poraqueiba seríceo Tulasne*” en el cual se muestra que el rendimiento obtenido del mesocarpio+encocarpio es del 11,726 %, siendo éste superior al obtenido en el presente estudio (Trevejo, Maury, 2002).

En la investigación “*Fatty acid profiles and tocopherol contents of Burini (Mauritia flexuosa), Patawa (Oenocarpus batava), Tacuma (Astrocaryum vulgare), Mari (Paraqueiba paraensis) and Inaja (Maximiliana maripa) Fruits*”. Se muestra que el rendimiento obtenido para la especie *Mauritia flexuosa* es de 38,42% de igual manera que en el caso anterior, el rendimiento obtenido es superior al de nuestro estudio (Cruz Rodrigues. *et. al*, 2010).

4.4 Determinación de tocoferoles y tocotrienoles

- Al realizar placas TLC con muestras saponificadas se determinó que la reacción se llevó a cabo. Al lado izquierdo de la placa se colocó el aceite puro mientras que al lado derecho se encontró el aceite saponificado (Fotografía 18). Es muy evidente el cambio en la coloración al realizarse la corrida de las dos muestras, por cuanto la reacción de saponificación se realizó exitosamente.



Fotografía 18. Placa TLC realizada para determinar una reacción de un aceite antes y después de ser saponificado.
Fuente: La autora

- Luego de la derivatización de las muestras los pesos moleculares de los compuestos varían, en el cuadro 2 se detallan los pesos moleculares de los tocoles antes y después de este proceso.

Compuesto	Peso molecular	Peso molecular + derivatizante ((CH ₃) ₃ SiO)
α- tocotrienol	424,66	496
β-tocotrienol	410,63	482,4
γ-tocotrienol	410,63	482,4
δ-tocotrienol	396,61	468,3
α- tocoferol	430,71	502,4
β-tocoferol	416,68	488,4
γ-tocoferol	416,68	488,4
δ-tocoferol	402,65	474,4

Cuadro 2. Pesos moleculares de los tocoles
Fuente: Núñez, 2007.

- En el cuadro 3 se muestran los principales iones de referencia que son característicos de cada uno de los compuestos y nos ayudaron a identificarlos.

Compuesto	Iones de Referencia (m/z)
α- tocoferol	503,2 ; 504,0 ; 237,7 ; 236,8
β-tocoferol	489,3 ; 490,1 ; 222,7 ; 223,7
γ-tocoferol	489,3 ; 490,1 ; 222,7 ; 223,7
δ-tocoferol	475,1 ; 475,9 ; 208,6 ; 209,5
α- tocotrienol	497,2 ; 498,0 ; 237,8 ; 237,0
β-tocotrienol	481 ; 484,0 ; 223,5 ; 222,6
γ-tocotrienol	481 ; 484,0 ; 223,5 ; 222,6
δ-tocotrienol	489,3 ; 490,1 ; 223,7 ; 491,0

Cuadro 3. Iones de Referencia de los tocoles
Fuente: Núñez, 2007.

- Mediante CG/EM usando el método descrito en el anexo 1, en la especie *Veitchia merrilli* se logró identificar el α-tocoferol, al que le corresponde un tiempo de retención de 12,19 min (Fig. 11).

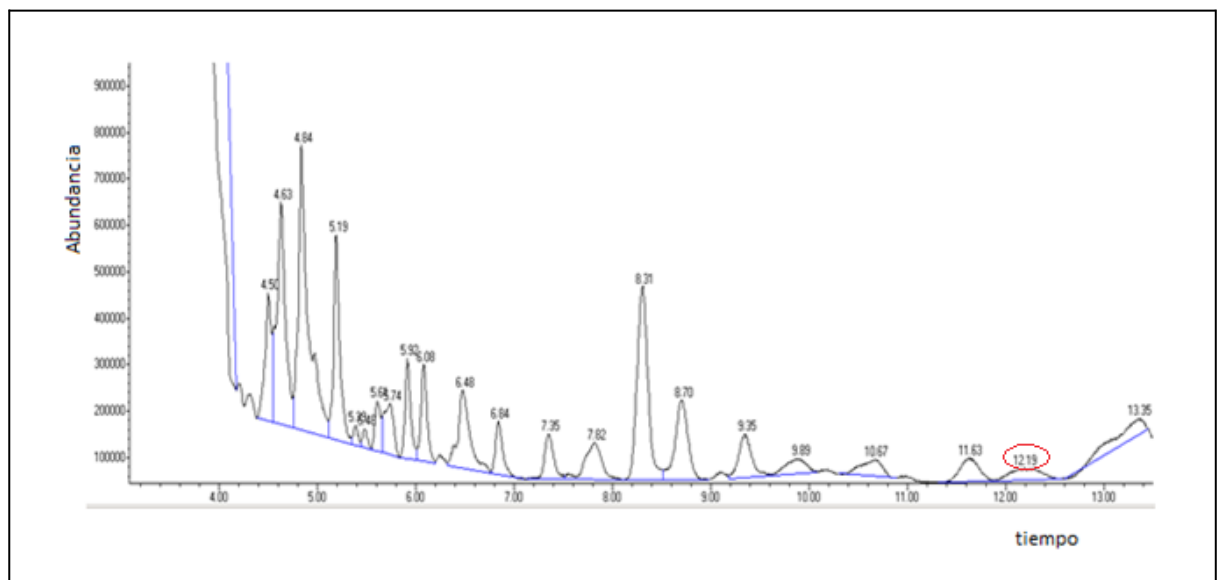


Fig 11. Cromatograma de la especie *Veitchia merrilli*
Fuente: La autora

En el espectro de masa se observó el ión molecular m/z 502 (Fig. 12), con fragmentos m/z 237, 277.

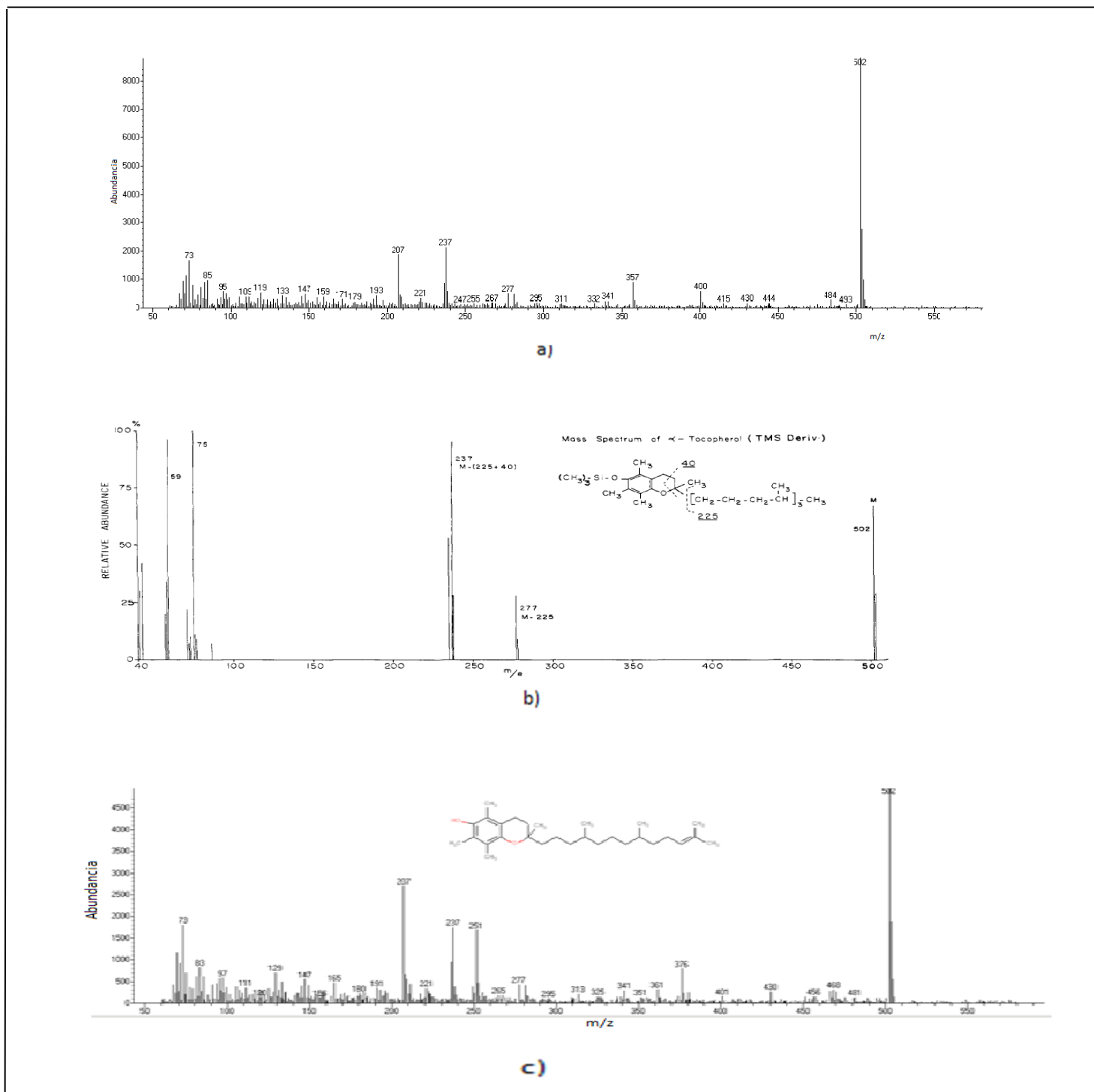


Fig 12. Espectro de masa de α -tocoferol en la especie *Veitchia merrilli*
Fuente: La autora

En la figura se muestra: **a)** Espectro de masa del estándar. **b)** Espectro de masa obtenido de (Mirmira, Edward, 1972). **c)** Espectro de masa de la muestra.

Se puede constatar que los tres espectros presentan la misma fragmentación molecular, es decir, se logró determinar la presencia de α -tocoferol en este aceite, ya que cada compuesto tiene su propia fragmentación molecular como se puede comparar en (Mirmira, Edward, 1972) y (Núñez, 2007).

En la figura 13 se muestran las fragmentaciones que ocurren en la molécula y mediante los cuales se obtienen los iones de referencia característicos para este compuesto, $(502 - (225)) = 277$; $(502 - (225 + 40)) = 237$.

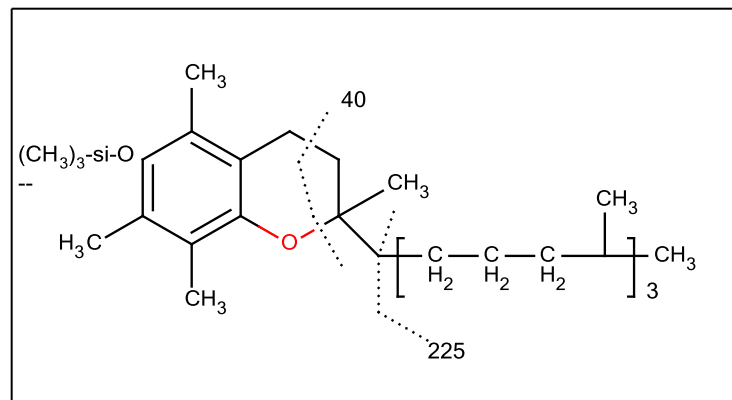


Fig 13. Fragmentos de la molécula α -tocoferol
Fuente: Mirmira, Edward, 1972.

- En la especie *Mauritia flexuosa* se logró identificar el β o γ -tocoferol y el α -tocoferol, a éstos les corresponde un tiempo de retención de 12,12 y 10,04 min, respectivamente (Fig. 14).

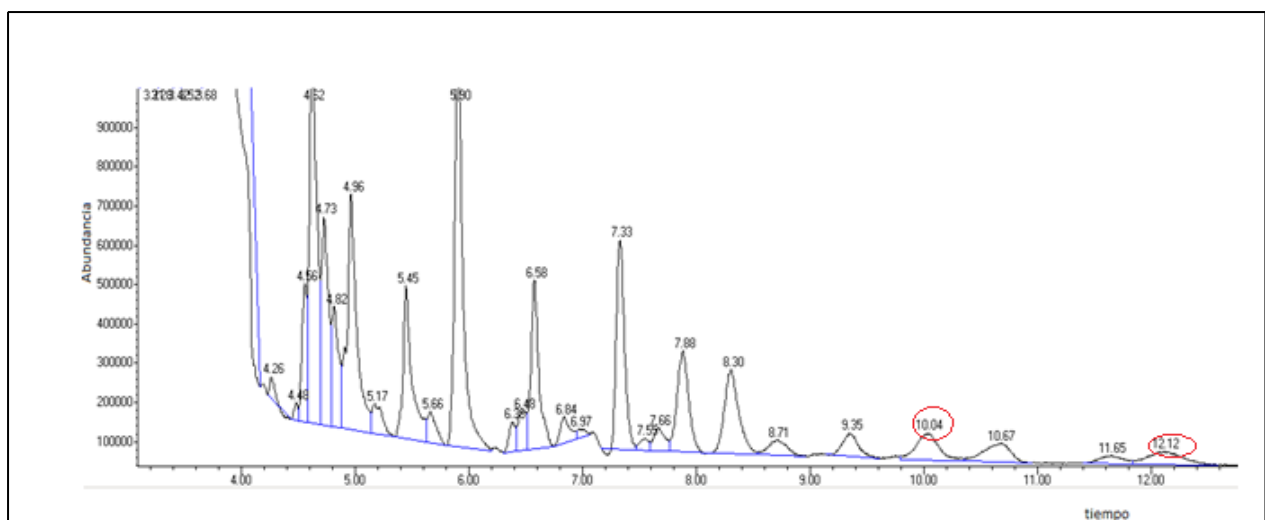


Fig 14. Cromatograma de la especie *Mauritia flexuosa*
Fuente: La autora

En el espectro de masa se observó el ión molecular m/z 488 (Fig. 15), con fragmentos m/z 223, 263.

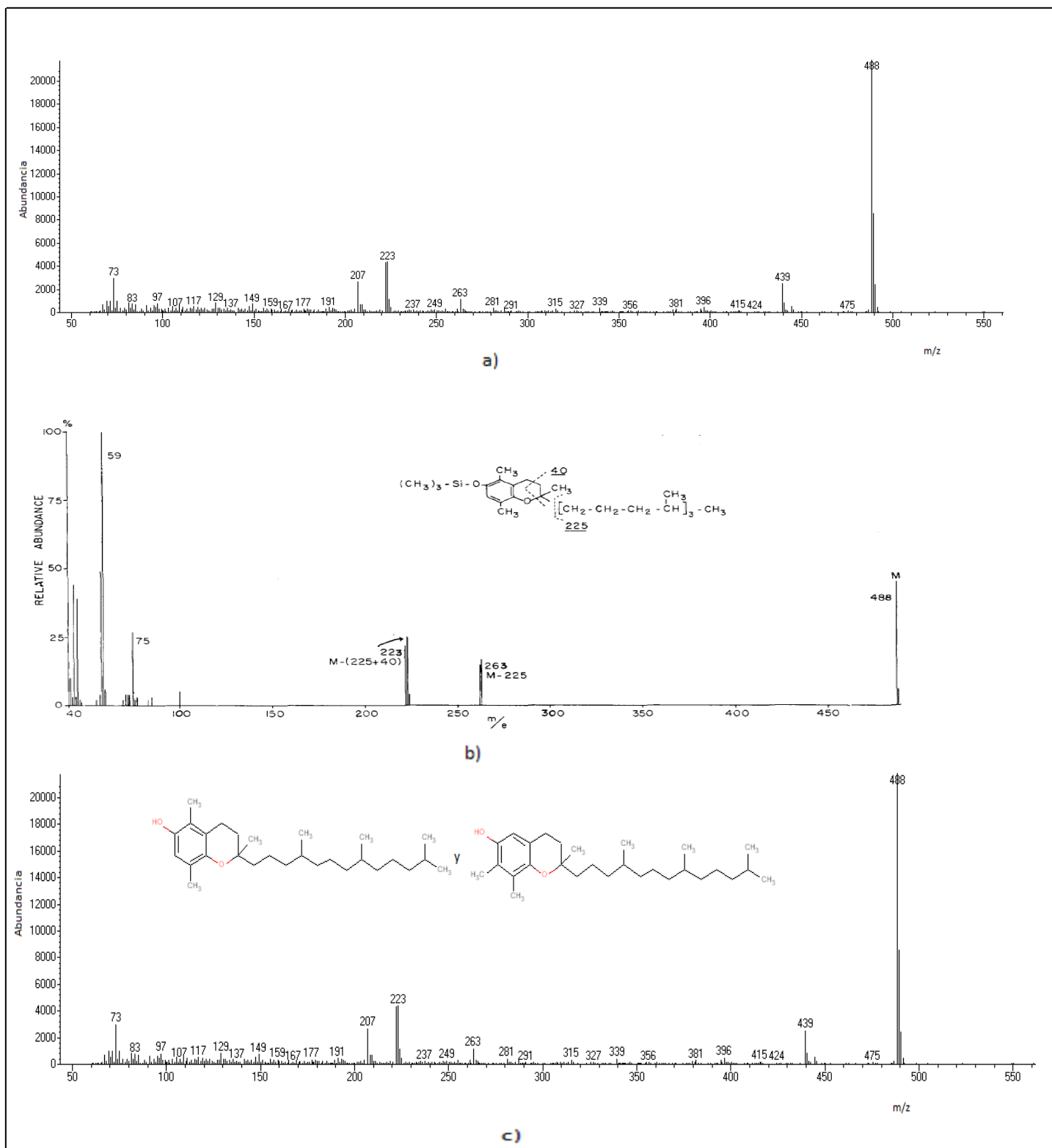


Fig 15. Espectro de masa de β o γ -tocopherol en la especie *Mauritia flexuosa*
Fuente: La autora

En la figura se muestra: **a)** Espectro de masa del estándar. **b)** Espectro de masa obtenido en (Mirmira, Edward, 1972). **c)** Espectro de masa de la muestra.

Donde se puede evidenciar que los tres espectros presentan la misma fragmentación molecular, es decir, se determinó la presencia de β o γ -tocoferol en esta muestra. Estos dos compuestos presentan la misma fragmentación molecular, lo que hace difícil su identificación mediante CG/EM, ya que este instrumento de identificación nos brinda espectros de masa similares para ambos compuestos, sin embargo se logró constatar los iones de referencia con los obtenidos en (Mirmira, Edward, 1972) y (Núñez, 2007). Cabe mencionar que estos dos compuestos difieren molecularmente en la ubicación de un grupo metilo por lo cual sus iones de referencia son idénticos.

En la figura 16 se muestran las fragmentaciones que ocurren en la molécula y mediante los cuales se obtienen los iones de referencia característicos para este compuesto, $(488-(225))=263$; $(488-(225+40))=223$.

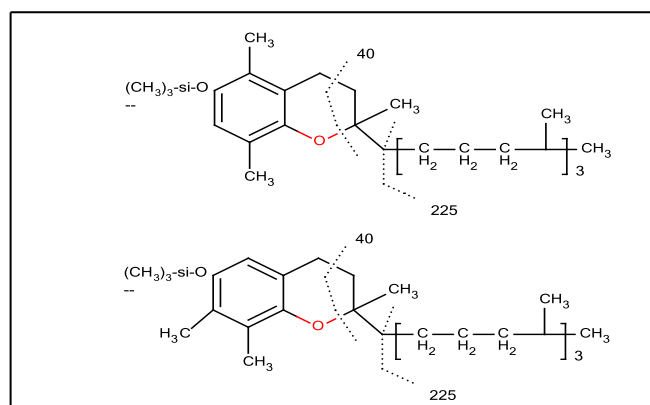


Fig 16. Fragmentos de las moléculas β o γ -tocoferol
Fuente: Mirmira, Edward, 1972

En el espectro de masa se observó el ión molecular m/z 502 (Fig. 17), con fragmentos m/z 237, 277.

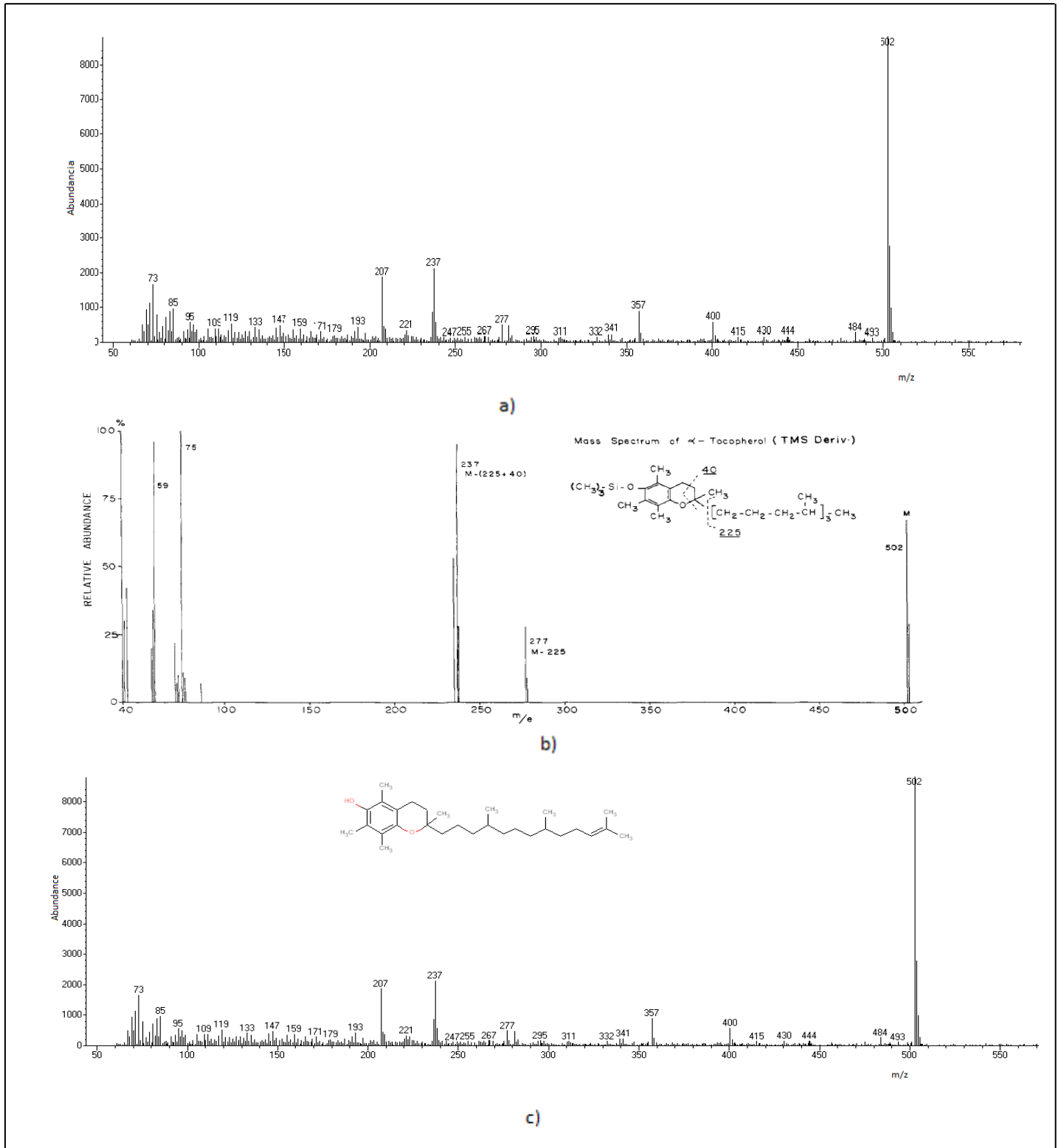


Fig. 17 Espectro de masa de α - tocoferol en la especie *Mauritia flexuosa*
Fuente: La autora

En la figura se muestra: **a)** Espectro de masa del estándar. **b)** Espectro de masa obtenido de (Mirmira, Edward, 1972). **c)** Espectro de masa de la muestra.

Se pudo verificar que los tres espectros presentan la misma fragmentación molecular, es decir, se logró determinar la presencia de α -tocoferol en este aceite, ya que cada compuesto tiene su propia fragmentación molecular como se puede comparar en (Mirmira, Edward, 1972) y (Nuñez, 2007).

En la figura 18 se muestran las fragmentaciones que ocurren en la molécula y mediante los cuales se obtienen los iones de referencia característicos para este compuesto, $(502 - (225)) = 277$; $(502 - (225 + 40)) = 237$.

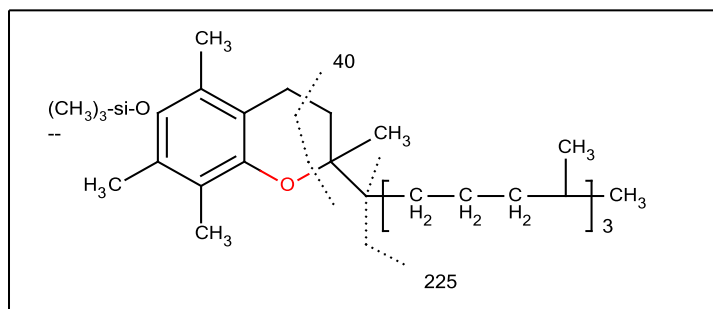


Fig. 18 Fragmentos de la molécula α -Tocoferol
Fuente: Mirmira, Edward, 1972.

En la investigación *“Identification and Estimation of Tocopherols and Tocotrienols in Vegetable Oils Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry”* los autores nos presentan los siguientes resultados:

Los espectros de masas de estos compuestos estrechamente relacionados muestran patrones similares de fragmentación, sólo difieren en sus pesos moleculares. No se observó diferencia entre los isómeros de posición β y γ por espectrometría de masas, sin embargo, pueden distinguirse por su espectro infrarrojo, ya que tienen características absorciones entre 7,5 y 9,8 μ (Mirmira, Edward, 1972).

Los resultados obtenidos en esta investigación fueron comparados con (Mirmira, Edward, 1972), donde se estudia la presencia de tocoles en aceites vegetales y se puede evidenciar muy claramente que obtienen los mismos iones moleculares que en el presente estudio.

5. CONCLUSIONES

- Se recolectaron 4 especies de palmeras en las provincias de Loja y Zamora Chinchipe, éstas especies son: *Weittinia maynensis*, *Prestoea acuminata*, *Veitchia merrilli*, *Mauritia flexuosa*. De las cuatro especies de palmeras recolectadas, se seleccionaron 2 (*Veitchia merrilli*, *Mauritia flexuosa*) con las cuales se procedió a la determinación de tocoles, debido a que su rendimiento en la extracción de aceite nos permitió realizar la técnica de saponificación con la cual se eliminó los ácidos grasos.
- La identificación de cada una de las especies se realizó en el Herbario Reinaldo Espinosa, en donde nos proporcionaron las muestras de herbario ahí existentes para comparar nuestras palmeras, y de ésta manera caracterizar las especies recolectadas.
- Los rendimientos obtenidos en la extracción de aceite por el método Soxhlet para las 4 especies son los siguientes: *Veitchia merrilli* en el mesocarpio 3,42%, endocarpio 0,44%; *Mauritia flexuosa* en el mesocarpio 2,83%, endocarpio 1,01%; *Weittinia maynensis* en el mesocarpio 0,22%, endocarpio 0,39%; *Prestoea acuminata* en el mesocarpio 0,05%, endocarpio 0,39%.
- Se determinó las propiedades físicas cuyos resultados obtenidos fueron: en la especie *Veitchia merrilli* el índice de refracción es 1,471, densidad relativa 0,9308, de color amarillo, líquido-viscoso. La especie *Mauritia flexuosa* tiene un índice de refracción de 1,4676, densidad relativa de 0,8882, su color es anaranjado, líquido-viscoso. Cabe mencionar que para la determinación de las propiedades físicas se usó únicamente los aceites vegetales que tenían mayores rendimientos en la extracción.

- Se seleccionó el método de extracción Soxhlet para realizar la caracterización química de los aceites, porque usó menor cantidad de solvente y se empleó un tiempo destilación de 2 horas. En la especie *Veitchia merrilli* se determinó la presencia de alfa tocoferol y en la especie *Mauritia flexuosa* se determinó la presencia de β o γ tocoferol y alfa tocoferol.

6. RECOMENDACIONES

- Los tocoles son muy sensibles al calor, por lo cual es importante al momento de usar el rotavapor en la etapa de saponificación no sobrepasar los 40 °C.
- El derivatizante se oxida rápidamente por lo que es necesario usarlo al instante, y no usar derivatizantes guardados.
- Si se desea determinar la presencia de β o γ -tocoferol en cualquier especie usar otra técnica analítica como por ejemplo HPLC o RMN.

7. BIBLIOGRAFÍA

- **Amaral Joanna S.**, (2005). Simultaneous Determination of Tocopherols and Tocotrienols in Hezelnutsby Normal Phase Liquid Chromatographic Method; The Japan Society for Analytical Chemistry; Portugal.
- **Balick, M. J.** (1982). Palmas neotropicales nuevas fuentes de aceites comestibles. Interciencia.
- **Borchsenius Finn & Moraes r. Mónica.**, (2006). Diversidad y usos de palmeras andinas (Arecaceae); 412-433.
- **Borgtoft Pedersen Henrik & Balslev.**, (1993). Palmas Útiles, Especies ecuatorianas para la agroforestería y extractivismo, Quito.
- **Bravo Mireya, Puratic Olga, Stephan René, Oviedo Iris.**, (1976). Vitamina E, Revista chilena de Pediatría; Chile.
- **Burnie, Geoff, Forrester, Sue.**, (2006). Botánica Guía ilustrada de plantas más de diez mil especies de la A a la Z y como cultivarlas; Alemania.
- **Chang Raymond & College.**, (2005). Química, séptima edición.
- **Da Cruz Rodrigues Antonio M., Darnet Sylvain, Da Silva Meller**, (2010); "Fatty acid profiles and tocopherol contents of Burini (*Mauritia flexuosa*), Patawa (*Oenocarpus batava*), Tacuma (*Astrocaryum vulgare*), Mari (*Paraqueiba paraensis*) and Inaja (*Maximiliana maripa*) Fruits".
- **Dewick Paul M.**, (2001). Medical Natural Products, School of Pharmaceutical University of Nottingham, UK.
- **Eitenmiller Ronald, Lee Junsoo.**, (2004). Vitamin E Food Chemistry, Composition, and Analysis; University of Georgia and Chungbuk National University Korea; New York.
- **González López José Amable.**, (2006). Densidad relativa; Tiempo Real S.A.
- **Harris Daniel C.** (2001) Análisis Químico Cuantitativo; Segunda Edición; Reverte S.A.; España.

- **Henderson Andrew, Galeno Gloria, Bernal Rodrigo.,** (1995). Field Guide to the Palms of the Americas; Princeton University; New Jersey.
- **Herrera López Eluid Andrés.,** (2007). Obtención y Caracterización de la materia insaponificable del aceite de Crisálida de Bombyx ori L. Híbrido Pilamo I; Universidad Tecnológica de Pereira, Facultad de Tecnología. Pereira.
- **Instituto de la Grasa (C.S.I.C.),** (2000). Chromatography analysis of minor constituents in vegetable oils; Journal of Chromatography; España.
- **JØrgensen Peter M & León Yanez Susana.,** (1999). Catalogue of the vascular plants of Ecuador; Missoun Botanical Garden, USA.
- **Mirmira, K & Edward, P.,** (1972). Identification and estimation of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils using gas Chromatography – Mass Spetrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry (USA) 20 (2): 240 – 245.
- **Mircya Bravo, Q.F. Olga Puratic, Dr. Rene Slephan, Iris Oviedo;** Vitamina E.
- **Murray Robert K., Bender David A., Botham Kathleen M., Kennelly Peter J, Rodwell Victor W., Weil P. Anthony.,** (2010). HARPER Bioquímica ilustrada, Veintiochoaba Edición; México.
- **Narel Y. Paniagua-Zambrana.,** (2005). Diversidad, densidad, distribución y uso de las palmas en la región del Madidi, noreste del departamento de La Paz (Bolivia).
- **Núñez Pizarro Roxana Patricia,** (2007). Evaluación del contenido de tocoferoles y tocotrienles en aceite de nuez de selecciones clonales de *Gevuina avellana* Mol.
- **Peterson M., Hoffman David, Mannrstedt-Fogelfors Birgitta;** (2006) Oat Tocols: Saponification vs. Direct Extraction and Analysis in High-Oil Genotypes.
- **Pocklington W.D. & Dieffenbacher A.,** (1988). Determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils and fats by high performance

Liquid Chromatography; Laboratory of the Government Chemist, Waterloo Road, London UK.

- **Preedy Victor & Watson Ronald.**, (2007). The Encyclopedia of Vitamin E.
- ***Prestoea acuminata* Palm** (en línea); responsable: Palm & Cycad Societies of Australia: disponible en la web: <http://www.pacsoa.org.au/palms/Prestoea/acuminata.html>. Última visita: julio 2012.
- **Skoog Douglas A., Holler James F., Nieman Tomothy A.**, (2001). Principios de Análisis Instrumental; Quinta Edición; España.
- **Sigma-Aldrich** (1997). Guide to derivatization reagents for GC. Bulletin 909A.
- **Toyo'aka Toshimasa.**, (1999). Modern derivatization methods for separation sciences; John Wiley & Sons Ltd. 1999.
- **Trejo Chávez Elmer, Maury Laura.**, (2002) Extracción y caracterización del aceite de *Poraqueiba sericea* Tulasne (UMARÍ); Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias de la UNAP-Iquitos-Perú.
- **Valcárcel Cases M., Gómez Hens A.**, (1988). Técnicas analíticas de separación, Editorial Reverté, Barcelona.
- **Watson Ronald Ross, Preedy Victor R.**, (2009). Tocotrienols Vitamin E Beyond Tocopherols, Taylor & Francis Group, USA.

8. ANEXOS

ANEXO I

CONDICIONES DE OPERACIÓN DE CG/EM

INSTRUMENT CONTROL PARAMETERS: 5973N

C:\MSDCHEM\1\METHODS\METHYL_STEARATE_SCAN_NEW.M

Control Information

Sample Inlet: GC
Injection Source: GC ALS
Mass Spectrometer Enabled

6890 GC METHOD

OVEN

Initial temp: 220 'C (On) Maximum temp: 300 'C
Initial time: 2.00 min Equilibration time: 0.50 min
Ramps:

#	Rate	Final temp	Final time
1	10.00	285	5.00
2		0.0	(Off)

Post temp: 0 'C
Post time: 0.00 min
Run time: 13.50 min

FRONT INLET (UNKNOWN)

BACK INLET (SPLIT/SPLITLESS)

Mode: Splitless
Initial temp: 275 'C (On)
Pressure: 28.05 psi (On)
Purge flow: 50.0mL/min
Purge time: 1.00 min
Total flow: 54.4mL/min
Gas saver: On
Saver flow: 50.0mL/min
Saver time: 2.00 min
Gas type: Helium

COLUMN 1

COLUMN 2

(not installed) Capillary Column
Model Number: Agilent 122-5532
DB-5ms, 0.25mm * 30m * 0.25um
Max temperature: 350 'C
Nominal length: 30.0 m
Nominal diameter: 250.00um
Nominal film thickness: 0.25um
Mode: constant flow
Initial flow: 1.8mL/min
Nominal init pressure: 28.05 psi

Average velocity: 52 cm/sec
Inlet: Back Inlet
Outlet: MSD
Outlet pressure: vacuum

FRONT DETECTOR ()

SIGNAL 1

Data rate: 20 Hz
Type: front detector
Save Data: On Save Data: On
Zero: 0.0 (Off)
Range: 0 Range: 0
Fast Peaks: Off Fast Peaks: Off
Attenuation: 0 Attenuation: 0

COLUMN COMP 1

(No Detectors Installed)

THERMAL AUX 1

Use: MSD Transfer Line Heater
Description: Interface mass
Initial temp: 250 °C (On)
Initial time: 0.00 min

#	Rate	Final temp	Final time
1	0.0(Off)		

POST RUN

Post Time: 0.00 min

TIME TABLE

Time Specifier Parameter & Setpoint

GC Injector

Back Injector:
SampleWashes3
Sample Pumps 6
Injection Volume 1.0 microliters
Syringe Size 10.0 microliters
Post Inj Solvent A Washes 3
Post Inj Solvent B Washes 0
ViscosityDelay0 seconds
Plunger Speed Fast
PreInjectionDwell0.00 minutes
PostInjectionDwell0.00 minutes

Column 1 Inventory Number: HP-FFAP
Column 2 Inventory Number: A015

MS ACQUISITION PARAMETERS

General Information

Tune File: atune. u
Acquisition Mode: Scan

MS Information
Solvent Delay: 3.00 min
EM Absolute: False
EM Off set: 0
Resulting EM Voltage: 1764.7

[Scan Parameters]

Low Mass: 60.0
High Mass: 580.0
Threshold: 0
Sample# : 2 A/D Samples 4

[MSZones]

MS Quad:150 C maximum 200 C
MS Source: 230 C maximum 250 C

END OF MS ACQUISITION PARAMETERS

TUNE PARAMETERS

EMISSION: 34.610
ENERGY : 69.922
REPELLER: 29.620
IONFOCUS : 90.157
ENTRANCE_LE :14.000
EMVOLTS : 1764.706
AMUGAIN : 1965.000
AMUOFFSET : 124.000
FILAMENT: 1.000
DCPOLARITY : 1.000
ENTLENSOFFS : 19.075
MASSGAIN: -1.022
MASSOFFSET: -10.131

ANEXO II

Norma ANFOR para la determinación de la densidad relativa a 20 °C

Principio:

La densidad relativa a 20 °C de un aceite vegetal se define como la masa de un determinado volumen de aceite vegetal a 20 °C sobre la masa de un volumen igual de agua destilada a 20 °C.

Nota:

- Si es necesario operar a una temperatura diferente debido a la naturaleza del aceite esencial para indicar la norma referente al aceite vegetal. La corrección para 20 °C es de 0,0007 a 0,0008 por grado centígrado.
- La masa volumétrica a 20 °C de un aceite vegetal se reporta como la masa de un cierto volumen del aceite vegetal a 20 °C.

Aparatos:

- Picnómetro de vidrio
- Baño termoestático, mantenido a 20 °C ± 0.2 °C.
- Termómetro de precisión graduado de 10 a 30 °C, con una variación de 0,2 a 0,1 °C.
- Balanza analítica.

Procedimiento:

- **Preparación del picnómetro:** Limpiar rigurosamente y luego enjuagar el picnómetro, lavar con etanol y luego con acetona, pasar por una corriente de aire seco. Si es necesario secar el exterior del picnómetro. Cuando se equilibre la temperatura en el cuarto de balanza pesar el picnómetro, con un tapón en su sitio con 1mg de precisión.
- **Peso del agua destilada:** Llenar el picnómetro con agua recién destilada a 20° C. Coloque el picnómetro en el baño termostático. Durante 30 min ajustar el nivel del agua hasta la marca, poner el tapón del picnómetro en su

sitio, secar el exterior del picnómetro. Cuando se equilibre la temperatura con el cuarto de balanzas pesar el picnómetro lleno con el tapón en su sitio con 1 mg de precisión lleno igual que en el caso anterior.

- **Peso del aceite vegetal:** Vaciar el picnómetro, enjuagar y secar como en el inicio. Efectuar las mismas operaciones pero en lugar de agua hacerlo con aceite vegetal.

Expresión de resultados:

La densidad relativa se la expresa con la siguiente fórmula

$$d_{20}^{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

d_{20}^{20} = densidad relativa a 20 °C, referido al agua a 20 °C

m_0 = es la masa en gramos del picnómetro vacío.

m_1 = es la masa en gramos del picnómetro con agua.

m_2 = es la masa en gramos del picnómetro con el aceite vegetal.

Se expresará los resultados con cuatro decimales.

ANEXO III

Norma ANFOR para la determinación del índice de refracción

Principio:

El índice de refracción de un aceite vegetal es el producto entre el seno del ángulo de incidencia y el seno del ángulo de refracción de un rayo luminoso de longitud de onda determinada, que pasa desde el aire a través del aceite vegetal, manteniendo la temperatura constante.

La longitud de onda específica es $589,3 \pm 0,3$ nm, correspondiente a la radiación D1 y D2 del espectro de sodio.

La temperatura de referencia es de 20 °C, salvo para los aceites vegetales q no son líquidos a esa temperatura. En este caso se deben adoptar las temperaturas de 25 a 30°C según el punto de fusión del aceite vegetal considerado.

Aparatos:

- **Refractómetro:** Se utilizó un refractómetro clásico que permita la lectura de los índices de refracción entre: 1.300 y 1.700 o con una precisión de $\pm 0,0002$:

Ajuste el aparato de manera que a una temperatura de 20 °C, se tengan los siguientes índices de refracción según:

1.3330 para agua destilada.

1.4906 para el p-cimeno.

1.5685 para el benzoato de bencilo.

1.6585 para el 1-bromo naftaleno.

Los productos patrón deben ser puros, de calidad para refractometría, deben también ajustarse con una lámina de índice de refracción conocida, según las indicaciones de fabricación del equipo.

Resultados:

- **Determinación:** Pasar una corriente de agua en el refractómetro, a fin de mantener el aparato a la temperatura de referencia de 20 °C salvo para los aceites vegetales que no son líquidos a esa temperatura. En este caso deben adoptarse las temperaturas de 20 y 30 °C, según el punto de fusión del aceite vegetal considerado. Esta temperatura no debe diferir de la temperatura de referencia más de $\pm 0,2$ °C y debe mantenerse a $\pm 0,2$ °C. Antes de poner la muestra en el instrumento, llevarla a una temperatura igual a la que se realizará la medida.
Para efectuar la lectura esperar que la temperatura sea estable.

Expresión de resultados

- **Cálculos:** En índice de refracción a la temperatura de referencia está dado por la fórmula:

$$n_D^{t'} = n_D^t + 0.0004(t' - t)$$

Donde:

$n_D^{t'}$ = valor de la lectura, obtenida a la temperatura t' , o aquella a la que se haya efectuado la determinación.

0.0004 = factor de corrección.

t' = temperatura a la que se efectuó la medición.

t = temperatura a 20°C.

ANEXO IV

TÉCNICA DE SAPONIFICACIÓN (Pocklington, Dieffenbacher, 1988)

1. Pesar exactamente 2 g de aceite extraído en un matraz de 100 ml, disolver la muestra en 8 ml de etanol al 96%, agitando constantemente.
2. Añadir 100 ml de pirogalol agitando constantemente.
3. Purgar el matraz con N₂, añadir 4 ml de solución de hidróxido de potasio al 60% (m/m) y tapar con un tapón de vidrio (toda la reacción debe hacerse en ausencia de luz por lo que todo el material usado fue cubierto con papel aluminio).
4. Colocar el matraz en baño maría a 26 °C y agitar vigorosamente por 10 min.
5. Añadir 50 ml de agua desionizada y transferir el contenido del matraz a un embudo de decantación de 250 ml. Lavar el matraz con 50 ml de dietiléter que contiene 0,1 % (m/m) de pirogalol y transferir el lavado al embudo.
6. En el embudo, dejar que las dos fases se separen y extraer la capa acuosa inferior.
7. Extraer nuevamente la capa acuosa inferior 4 veces con alícuotas de 30 ml de dietil éter y combinar los extractos de éter.
8. Lavar los extractos combinados de dietiléter con 50 ml de agua y luego con 30 ml de HCl 0,01 moles por litro y añadir 2 g de sulfato de sodio anhidro, mezclando suavemente para absorber el H₂O.
9. Filtrar con papel filtro los extractos de éter y recoger el filtro en un balón ámbar.
10. Llevar al rotavapor a una presión reducida y a una temperatura no mayor a 40 °C.
11. Lavar las paredes del matraz con hexano.
12. Si permanece un residuo líquido en el matraz añade etanol y evapore a sequedad y transfiera en el contenido a un matraz de 50 ml.