

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL A PARTIR DE HOJAS DE NEEM (AZADIRACHTA INDICA A. JUSS), USANDO LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA CON CO₂ COMO SOLVENTE Y EXTRACCIÓN CONVENCIONAL CON AGUA.

Presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela
Por el Br Rosas G. Luis F
Para optar al Título de
Ingeniero Químico.

Caracas, 2009

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL A PARTIR DE HOJAS DE NEEM (AZADIRACHTA INDICA A. JUSS), USANDO LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA CON CO₂ COMO SOLVENTE Y EXTRACCIÓN CONVENCIONAL CON AGUA.

TUTORES ACADÉMICOS: Profa. Alejandra Meza
Prof. Armando Vizcaya

Presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela
Por el Br Rosas G. Luis F
Para optar al Título de
Ingeniero Químico.

Caracas, 2009

Caracas, Marzo de 2009

Los abajo firmantes, miembros del Jurado designado por el Consejo de Escuela de Ingeniería Química, para evaluar el Trabajo Especial de Grado presentado por el Bachiller Luis F. Rosas G. titulado:

**OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL A PARTIR DE HOJAS DE NEEM
(AZADIRACHTA INDICA A. JUSS), USANDO LOS MÉTODOS DE
EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA CON CO₂ COMO SOLVENTE Y EXTRACCIÓN
CONVENCIONAL CON AGUA.**

Consideran que el mismo cumple con los requisitos exigidos por el plan de estudios conducente al Título de Ingeniero Químico, y sin que ello signifique que se hacen solidarios con las ideas expuestas por el autor, lo declaran APROBADO.



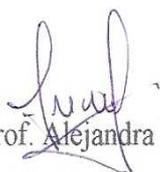
Prof. Adriana García.

Jurado.



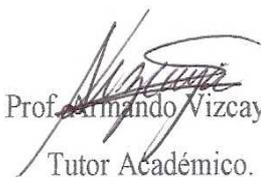
Prof. Francisco Yáñez.

Jurado.



Prof. Alejandra Meza.

Tutor Académico.



Prof. Armando Vizcaya.

Tutor Académico.

DEDICATORIA.

A mis padres por confiar en mí, por todas las veces que me enseñaron que la verdad es lo más importante, por soportarme las veces que fui insoportable, por entender cuando no pude, por celebrar conmigo mis pequeños pasos y por todas las cosas por las cuales nunca podre pagarles. Pero sobre todo por el amor que me brindaron siempre. Hoy se que cada uno tiene una manera distinta de amarme y espero que todo el esfuerzo realizado sea evidencia del amor desmesurado que siento por ustedes.

A mi hermanita por ser siempre un ejemplo de constancia y voluntad.

A mis Abuelos, en especial a mi Abuelita Carmen que siempre la llevaré en el corazón. Sé que desde algún lado debe estar pendiente de mí.

A todo el resto de mi extensa familia. Primos, Tíos y Padrinos.

A todos los profesores con los que tuve la oportunidad de ver clases en mi formación como profesional.

A todos mis amigos y compañeros de clases por soportar mis chistes malos, o mejor dicho mis curiosidades del lenguaje, por celebrar conmigo, por ayudarme, por darme ánimos, pero sobre todo por ser sinceros conmigo las veces que lo necesité. Vicente, Mon, Chico, Gaby, Iván, Dalia, Fariña, Oliver, Juan, Tania, Laura, Kelly, Arlene, Yari, Nora, Laurent, Hussein, Toto, Made, Andru, Albert, El Negro, Rafa, Kathy, Caro, Yosmar, Aura, Benito, Egleni, Cristina, Jonamet, Rey, Samantha, Alberto, Steffan, Tupa, Jeanqui, Miguel, Ini, Daniel, Nacho, Carlitos, Patricia, Angela, Blanca, Omaira y Eyra Nunca los olvidaré.

AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad que se le entregó un niño y lo convirtió en el hombre que soy. Donde descubrí las cosas más maravillosas de la vida, donde aprendí a defenderme, donde reí, donde lloré, donde corrí, donde me enamoré. Donde entendí que de la dedicación y del trabajo, es de donde nace el conocimiento; y el conocimiento al menos para mí, no es más que la evidencia de la evolución del ser humano. Siempre diré con orgullo que soy Ucevista.

A mis Tutores, la Prof. Alejandra Meza y el Prof. Armando Vizcaya, por ayudarme a culminar esta etapa tan importante para mi formación profesional.

Al Prof. Francisco Yáñez por toda su asistencia y colaboración a lo largo de este Trabajo Especial de Grado.

A la Prof. Oglioly Domínguez, por ayudarme a entender mejor los parámetros analíticos involucrados en este Trabajo Especial de Grado.

Al técnico del Laboratorio de Operaciones Unitarias Alexander Pérez y muy especialmente al Señor Armando Martínez, quien no solo me ayudo con los equipos de este Trabajo Especial de Grado, sino que me enseñó que la experiencia y la sabiduría solo se obtienen con amor al trabajo.

Rosas G., Luis F.

**OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL A PARTIR DE HOJAS DE NEEM
(AZADIRACHTA INDICA A. JUSS), USANDO LOS MÉTODOS DE
EXTRACCIÓN SUPERCÁRITICA CON CO₂ COMO SOLVENTE Y EXTRACCIÓN
CONVENCIONAL CON AGUA.**

Tutores Académicos: Prof. Alejandra Meza y Prof. Armando Vizcaya. Caracas, UCV,
Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería Química. Año 2009, 94 pág.

Palabras Clave: NEEM, ACEITES ESENCIALES, HIDRODESTILACIÓN,
EXTRACCIÓN SUPERCÁRITICA.

Resumen: Esta investigación se llevó a cabo en los módulos I y III de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Central de Venezuela, en la misma se ejecutaron experiencias referentes a extracción convencional con agua o hidrodestilación, así como; de extracción supercárica usando CO₂ como solvente. Se usaron hojas de árbol de Neem provenientes de una planta ubicada en la Facultad de Agronomía en el Núcleo de la Universidad Central de Venezuela en el estado Aragua.

La justificación de este estudio corresponde a que el árbol de Neem puede crecer en la mayoría del territorio nacional, el aceite esencial de esta planta contiene gran cantidad de compuestos importantes para el desarrollo de productos farmacéuticos; así como, productos insecticidas. Estos productos son ampliamente desarrollados en todos los países donde crece la planta y existe poco estudio y desarrollo de la misma en Venezuela. Las hojas de Neem fueron usadas para esta investigación; ya que, tradicionalmente se extrae el aceite esencial de Neem de las semillas, pero la relevancia de estudiar las hojas recae en que las mismas se dan todo el año y los árboles producen los frutos envoltivos de la semilla una o dos veces cada año.

El trabajo se desarrolló según un marco metodológico previamente establecido compuesto en primer lugar, por la influencia del uso de un cosolvente que favoreciera la extracción supercárica, seguido por la variación de la presión y la temperatura sobre este método de extracción. En cuanto a la extracción convencional con agua el parámetro a variar fue el volumen de este solvente. También se estudió la viabilidad de la aplicación de uno de estos métodos, según los compuestos extraídos. Finalmente, se realizó una caracterización en base a la espectroscopía de infrarrojos para estudiar la composición de las muestras obtenidas en cada experiencia.

El método que permitió obtener un mayor rendimiento fue la extracción supercárica (30,65%), comparado con la hidrodestilación (26,20%) y la extracción soxhlet con etanol (24,33%). La caracterización de los grupos funcionales analizados en los espectros de infrarrojo, indica la presencia de los compuestos más pesados o menos volátiles del aceite esencial extraído de hojas de Neem, principalmente amidas, éteres y aldehídos entre otros.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xv
CAPÍTULO I.....	1
FUNDAMENTOS DE LA INVESTIGACIÓN.	1
I.1 INTRODUCCIÓN.	1
I.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	3
I.3 OBJETIVOS.	5
I.3.1 Objetivo general:	5
I.3.2 Objetivos específicos:	5
CAPÍTULO II.....	6
ANTECEDENTES.	6
II.1 “Desarrollo de un bioinsecticida a partir de la azadiractina presente en el aceite de Neem (Azadirachta Indica)”	6
II.2 “El Árbol de Neem Azadirachta a Juss”. Pasantía de Investigación	7
II.3 “Extracción de la Nimbina de la semilla de Neem usando CO ₂ y una mezcla de CO ₂ -Metanol en condiciones supercríticas”	7
II.4 “Formulación de insecticidas a base de azadiractin presente en el árbol de Nim”.	8
II.5 “Comparación de procesos de extracción del aceite esencial de vetiver”	9
CAPÍTULO III	10
MARCO REFERENCIAL	10
III.1 EL ÁRBOL DE NEEM	10
III.2 CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS DEL ÁRBOL DE NEEM.....	10
III.3 MECANISMO DE ACCIÓN DEL NEEM.....	12

III.4 LA HOJA DE NEEM Y SU COMPOSICIÓN QUÍMICA.....	12
III.5 USOS DEL NEEM.....	14
III.5.1 Contra la plaga.....	14
III.5.2 Medicinales.....	14
III.5.3 Punto de vista ecológico.....	15
III.5.4 Fuente de Madera.....	15
III.5.5 Mejoramiento del suelo.....	15
III.6 Aceites esenciales.....	16
III.7 Propiedades físicas y químicas de los aceites esenciales.....	17
III.8 Composición química de los aceites esenciales.....	18
III.9 Clasificación de los aceites esenciales.....	19
III.10 COMPOSICION QUIMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE NEEM.....	21
III.10.1 La Azadiractina.....	22
III.10.2 La Nimbina.....	23
III.11 Métodos de extracción de los aceites esenciales.....	24
III.12.1 Extracción convencional.....	26
III.12.2 Extracción con fluidos supercríticos.....	27
III.13 VENTAJAS DEL USO DE CO2 SUPERCRÍTICO COMO DISOLVENTE EN PROCESOS DE EXTRACCIÓN.....	29
III. 14 COSOLVENTES.....	30
III.15 Métodos de caracterización química.....	30
1 Infrarrojo.....	30
CAPÍTULO IV.....	32
METODOLOGÍA.....	32
IV.1 PRUEBAS PRELIMINARES.....	32

IV.1.1	Uso de un cosolvente.....	33
IV.1.1.1	Experiencia del montaje tipo soxhlet con etanol como solvente.....	33
IV.1.2	Influencia de cortar las hojas en el equipo de extracción supercrítica.	34
IV.2	Extracción Supercrítica usando CO ₂ como solvente.	34
IV.3	Extracción Convencional con agua.	35
IV.4	Descripción del equipo y desarrollo cronológico para la prueba preliminar de Extracción con etanol como solvente	36
IV.4.1	Descripción del equipo para la experiencia de extracción por arrastre de vapor de etanol como solvente.	36
IV.4.2	Desarrollo cronológico de la experiencia de extracción convencional usando etanol como solvente.	37
IV.4.2.1	Acondicionamiento del equipo.....	37
IV.4.2.2	Operación del equipo	38
IV.4.2.3	Descarga del extracto	39
IV.5	Descripción del equipo y desarrollo cronológico para las pruebas de Extracción Supercrítica usando CO ₂ como solvente.....	39
IV.5.1	Descripción del equipo para el método de extracción con CO ₂ como solvente en condiciones supercríticas.	39
IV.5.2	Desarrollo cronológico de la experiencia de extracción supercrítica.	41
IV.5.2.1	Acondicionamiento del equipo.....	41
IV.5.2.2	Operación del equipo	42
IV.5.2.3	Descarga del extracto	43
IV.6	Descripción del equipo y desarrollo cronológico correspondiente a las pruebas de Extracción convencional con agua.	44
IV.6.1	Descripción del equipo en la destilación con agua.....	44
IV.6.2	Desarrollo cronológico de la experiencia de extracción convencional con agua o hidrodestilación.....	45

IV.6.2.1 Acondicionamiento del equipo.....	45
IV.6.2.2 Operación	45
IV.6.2.3 Descarga del equipo.	46
CAPÍTULO IV	47
PRESENTACION Y ANALISIS DE LOS RESULTADOS.	47
IV.1 CONSIDERACIONES GENERALES	47
IV.2 Preparación y acondicionamiento de los equipos.....	48
IV.3 ANÁLISIS DE las muestras obtenidas	50
IV.3.1 Análisis de las muestras obtenidas en el estudio de la influencia del uso de agua y etanol como cosolventes.	51
IV.3.1 Análisis de las muestras obtenidas en el estudio de la influencia de disminuir el tamaño de las hojas de Neem.	56
IV.3.3 Análisis de las muestras obtenidas en la extracción supercrítica correspondientes al incremento de la presión.....	58
IV.3.4 Análisis de las muestras obtenidas en la extracción supercrítica correspondientes al incremento de la temperatura.	63
IV.3.5 Análisis de las muestras obtenidas en las experiencias de destilación convencional con agua.....	68
CAPÍTULO V	75
CONCLUSIONES.....	75
CAPÍTULO VI.....	77
RECOMENDACIONES.	77
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	79
ANEXOS.....	82
ANEXO A: Datos experimentales recolectados durante la investigación, vinculados al cálculo del porcentaje de rendimiento.	82

ANEXO B: Datos experimentales recolectados durante la investigación, vinculados al cálculo de la densidad.....	83
ANEXO C: Cálculo del porcentaje de rendimiento de las muestras obtenidas.....	84
ANEXO D: Cálculo de la densidad de las muestras obtenidas.....	85
ANEXO E: Imágenes de los equipos utilizados en la investigación.-.....	87
Anexo F: Tablas de interpretación de Espectros de Infrarrojo (Wade, 1993).....	91

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura N° 1: Hojas de Neem y Fruto en plena madurez. (Barroeta 2005).	11
Figura N° 2: Hojas de árbol de Neem pertenecientes a la Facultad de Agronomía Universidad Central de Venezuela.	13
Figura N° 3. Compuestos oxigenados presentes en los aceites esenciales.....	19
Figura N° 4: Estructura química de la Azadiractina.....	22
Figura N° 5: Estructura molecular de la Nimbina.	23
Figura N° 6. Diagrama presión-temperatura de una sustancia pura	28
Figura N°7: Diagrama del equipo de extracción convencional con etanol.	37
Figura N° 8. Diagrama del equipo de extracción con fluido supercrítico.....	40
Figura N°9: Diagrama del equipo de destilación con agua.	444
Figura N° 10: Experiencia tipo soxhlet en un tiempo inicial y luego de las 24 horas requeridas por el método	51
Figura N°11: Espectro infrarrojo de la prueba realizada con el montaje tipo soxhlet usando 200ml de Etanol como solvente.....	52
Figura N°12 Obstrucción del equipo de extracción supercrítica usando etanol como cosolvente.....	53
Figura N°13: Hojas remanentes de la extracción supercrítica usando agua como cosolvente.	54
Figura N°14: Comparación de los espectros obtenidos en las experiencias de extracción supercrítica usando etanol y agua como cosolvente.....	55
Figura N°15: Comparación de los espectros obtenidos en las experiencias de extracción supercrítica cortando las hojas y con las hojas sin cortar	57

Figura N°16: Espectro infrarrojo de la prueba de Extracción Supercrítica trabajando a 1300 psi y a temperatura ambiente.	59
Figura N°17: Comparación de los espectros obtenidos en las experiencias de incremento de presión usando extracción supercrítica, trabajando a 1300 psi, 1600 psi y 1900 psi	60
Figura N°18: Influencia de la presión sobre el rendimiento en las pruebas de extracción supercrítica usando CO ₂ como solvente.	62
Figura N°19 Espectro infrarrojo de la prueba de Extracción Supercrítica trabajando a 1900 psi y a 30°C.	63
Figura N°20: Comparación de los espectros obtenidos en las experiencias de incremento de temperatura trabajando a una presión de 1900 psi, usando extracción supercrítica a 30°C, 45°C y 60°C.....	65
Figura N°21: Influencia del incremento de la temperatura en las pruebas de extracción supercrítica usando CO ₂ como solvente, y trabajando a una presión fija de 1900 psi.	67
Figura N°22: Espectro infrarrojo de la prueba de Extracción Convencional con agua trabajando con un volumen de agua de 200ml.	68
Figura N°23: Comparación de los espectros obtenidos en las experiencias de hidrodestilación, variando la cantidad de solvente utilizada para 20ml y 400 ml de agua. .	69
Figura N°24: Variación de las densidades calculadas de las muestras con respecto a las densidades de los solventes puros.	73
Figura N°25: Variación del índice de refracción de las muestras con respecto al de los solventes puros.	73
Figura N°26: Equipo de extracción Supercrítica.....	87
Figura N°27: Bombona de CO ₂	87
Figura N°28: Montaje de prueba de hidrodestilación.....	88
Figura N°29: Montaje tipo soxhlet.....	88
Figura N° 30: Autoclave de presurización RP-01 con CO ₂	89
Figura N° 31: Diferencia entre las hojas después del proceso de extracción con el método soxhlet y con el método de hidrodestilación	89

Figura N° 32: Montaje de las experiencias que involucran el incremento de la temperatura.
.....90

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla N° 1: Composición de las hojas de Neem.	13
Tabla N° 2. Compuestos Terpénicos	18
Tabla N° 3: Clasificación del aceite esencial de Neem.....	20
Tabla N° 4: Grupos terpénicos que se encuentran en el aceite esencial de Neem y lugar de la planta donde se encuentran en mayor proporción.	21
Tabla N° 5: Propiedades de algunos solventes comúnmente usados en condiciones supercríticas	29
Tabla N°6: Muestras obtenidas durante cada experiencia y parámetros de operación	48
Tabla N° 7. Índice de refracción y densidad de las muestras recogidas en cada experiencia.	72
Tabla N°8: Datos recolectados para el cálculo de los porcentajes de rendimiento.	82
Tabla N°9: Datos recolectados para el cálculo de las densidades de las muestras.....	83

CAPÍTULO I

FUNDAMENTOS DE LA INVESTIGACIÓN.

I.1 INTRODUCCIÓN.

Los primeros escritos que indican que el Neem se usaba como medicamento datan de más de 4.500 años de antigüedad aproximadamente. En los Altos del Harappa, una de las grandes civilizaciones del mundo antiguo, ya cultivaban Neem, como demostraron los hallazgos encontrados en las excavaciones realizadas en diversos puntos del Harappa y Mohenjo-Daro en la India Norte Occidental, donde entre otros preparados se encontraban entre las ruinas, los compuestos con Neem.

Entre los documentos más antiguos encontrados que se han traducido, se encuentran el Caraka-Samhita (de aprox. 500 a.C.), y Susruta Samhita (300 d.C.). Estos libros representan la fundación del sistema hindú de curación natural. En estos escritos el Neem se menciona en casi 100 páginas, tratando una gama amplia de enfermedades y síntomas, la mayor parte de las que sufre la humanidad.

El Neem fue venerado durante largo tiempo por sus muchísimas propiedades para cuidar la salud, en un programa que abarca desde la cuna a la tumba, forma parte de casi todos los aspectos de la vida en muchas partes del Subcontinente indio, desde tiempos ancestrales hasta nuestros días.

El método clásico para la obtención de aceite esencial de Neem es la extracción con agua o hidrodestilación, pero éste es un método rudimentario y antiguo. También es conocida la extracción convencional con solventes orgánicos, pero su principal inconveniente es el largo tiempo que este proceso de extracción toma.

Es por esto que se buscan nuevos métodos de obtención como la extracción supercrítica con Dióxido de carbono (CO₂), en donde se disminuye el tiempo de obtención y se mejora la calidad del producto. La principal razón por la cual se usa este solvente es que es muy fácil de que se alcancen las condiciones supercríticas del mismo, también el mismo es relativamente económico.

Es por estas razones que se planteó un estudio en el cual, se evaluó y comparó la extracción supercrítica con CO₂ y la extracción convencional con agua para la obtención de la aceite esencial de Neem a partir de las hojas del mismo, para así en base a datos experimentales resultado de la aplicación de estos métodos, tomar la decisión ingenieril más acertada a la hora que se requiera una aplicación industrial.

Este trabajo especial de grado pretende determinar las mejores condiciones de extracción con CO₂ supercrítico como solvente por medio de la evaluación de variables claves del proceso como temperatura y presión, así como comparar los resultados de dicha experiencia con la hidrodestilación, mediante la cuantificación de parámetros comunes en ambas pruebas como lo son la cantidad de extracto obtenido, el porcentaje de rendimiento y también mediante la posterior caracterización que se realizará sobre cada una de las muestras obtenidas tanto en la experiencia de extracción supercrítica con CO₂ como en la experiencia de hidrodestilación.

A lo largo de este Trabajo Especial de Grado se estudiarán en primer lugar, los aspectos teóricos referentes al mismo, seguido de la metodología usada para llevar a cabo cada una de las experiencias. Posteriormente se presentarán y discutirán los resultados obtenidos, y finalmente se muestran las conclusiones y recomendaciones para experiencias posteriores, vinculadas a la investigación.

I.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El árbol de Neem es llamado también árbol milagroso, ya que es conocido por sus inmejorables cualidades para combatir las plagas que afectan las plantas, mejorar la alimentación bovina y como medicamento para los humanos, entre otras propiedades, por lo cual ha llamado la atención de los investigadores en la búsqueda de alguna fuente de materia prima de alta calidad y bajo precio.

Quizás la principal ventaja del Neem es que crece hasta seis metros de altura en zonas muy áridas, donde otras especies no lo harían, y requiere cantidades mínimas de humedad y precipitación para subsistir. Este árbol necesita una atención mínima y si no se maltrata, sigue creciendo; además, es una de las pocas especies que mantiene su follaje aún en épocas de sequía. Es por estas propiedades que el Neem llega a tierras americanas, principalmente a las de los países más cercanos al Ecuador, provocando así que sean estudiados los métodos de extracción del aceite esencial del mismo, ya que al ser utilizado con fines farmacéuticos y en la formulación de insecticidas, hallar el método más efectivo para obtener su esencia constituye el primer paso para la fabricación a escala industrial de los mismos.

El árbol de Neem tiene un vasto uso en toda su extensión según sea la parte del mismo que de la cual se disponga. Entre las funciones más importantes se tiene que principalmente la madera se usa en la construcción, de la semilla se obtiene aceite para faroles, de la pulpa se obtiene metano y de semillas y hojas la materia prima para hacer insecticidas.

Más de la mitad de los medicamentos modernos, desde la aspirina hasta los nuevos y útiles para tratar el cáncer de seno, tienen su origen en los ingredientes obtenidos de las plantas. Los médicos del sub-continente Indio han desarrollado un extenso conocimiento médico basado en las plantas medicinales que no tienen paralelo en el mundo.

El Neem, una de las más antiguas y más usadas plantas medicinales del mundo, usada como uno de los ingredientes más importantes en las preparaciones de los Indios, se le ha querido y respetado en la India por más de 4.000 años. Históricamente en Neem ha sido usado para ayudar al cuerpo a combatir enfermedades crónicas o temporales.

Actualmente, se continúan encontrando más aplicaciones medicinales del Neem. Los compuestos hallados en la semilla, corteza y hojas del árbol han sido probados como antiséptico, antifebriles, antiinflamatorios, antivirales y fungicidas. La efectividad del Neem ha sido demostrada un buen número de veces.

En la Facultad de Ingeniería de la UCV, se han venido realizando estudios referentes a la extracción supercrítica en productos agrícolas como el Cacao (Soledad, 2007), Café (González, 2007) y Vetiver (Armas y Corredor, 2007). Todos estos trabajos han sido pioneros al trabajar con cada uno de los frutos anteriormente mencionados. En Venezuela, en el área de Ingeniería Química se ha estudiado poco éste árbol, del cual no se aprovecha casi ninguna de las cualidades antes mencionadas. Este trabajo especial de grado espera obtener resultados positivos con la extracción de aceite esencial de hojas de Neem usando los métodos de extracción supercrítica y de extracción convencional con agua, para así estudiar la factibilidad de la aplicación de alguno de estos métodos a nivel industrial.

I.3 OBJETIVOS.

I.3.1 Objetivo general:

Establecer las condiciones óptimas de extracción del aceite esencial extraído de hojas de Neem usando los métodos de extracción supercrítica con CO₂ como solvente y compararlos con los obtenidos por extracción convencional con agua.

I.3.2 Objetivos específicos:

Este Trabajo Especial de Grado tiene como finalidad el cumplimiento de una serie de objetivos específicos que permitirán la obtención de aceite esencial de Neem mediante sus hojas, a través del proceso de extracción supercrítica así como también obtener esta sustancia por medio del proceso de extracción convencional con agua. A continuación se mencionan los objetivos específicos planteados:

- ❖ Aplicar el método de extracción supercrítica usando CO₂ como solvente a hojas de Neem para determinar el porcentaje de recuperación y posteriormente caracterizar los extractos obtenidos.
- ❖ Determinar la presión y temperatura óptima de trabajo sobre las hojas de Neem usando el método de extracción supercrítica con CO₂ como solvente.
- ❖ Aplicar el método de extracción convencional con agua o hidrodestilación a hojas de Neem para determinar el porcentaje de recuperación y posteriormente caracterizar los extractos obtenidos.
- ❖ Determinar la influencia de la variación del volumen en las pruebas de extracción convencional con agua o hidrodestilación.
- ❖ Comparar los métodos de extracción para determinar cuál sería el más efectivo en cuanto a la cantidad y calidad del extracto, para así poder decidir cuál de estas tecnologías sería más eficiente.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES.

Para la realización de este trabajo de grado, se realizó una investigación sobre los diferentes trabajos referentes a la extracción supercrítica y a las características más relevantes del árbol de Neem:

II.1 “Desarrollo de un bioinsecticida a partir de la azadiractina presente en el aceite de Neem (Azadirachta Indica)” (Montañez 2005).

En este trabajo de investigación se estudiaron los aspectos más importantes de la planta de Neem y de la azadiractina para así formular un insecticida a base de este terpenoide, también se estudiaron otros aspectos como la influencia del insecticida formulado sobre ciertas enfermedades y los factores que alteran la estabilidad en el tiempo de los mismos. Las conclusiones de mayor interés para este trabajo especial de grado son:

- ✓ Los insecticidas sintéticos ejercen un efecto negativo en la salud de los seres humanos, ya que causan daños, en ocasiones irreparables sobre el sistema nervioso humano, los cuales pueden persistir mucho tiempo después de finalizada la exposición a los mismos.
- ✓ Se requiere implementar la utilización de materiales alternativos en la elaboración de insecticidas, que no pongan en riesgo la salud de los seres humanos.
- ✓ La azadiractina presente en el aceite de Neem puede ser utilizada como componente activo para la formulación de un repelente, ya que posee propiedades insecticidas.
- ✓ La azadiractina contenida en las diferentes partes del árbol de Neem constituye una estrategia efectiva a ser usada en los programas de control de plagas, pues presenta diferentes mecanismos de acción, lo que garantiza un efecto prejudicial en la plaga, sin el riesgo de incrementar la resistencia en las mismas, ya que la azadiractina no puede ser sintetizada artificialmente en el laboratorio dado a la complejidad de su molécula, lo que dificulta que las plagas desarrollen resistencia.

II.2 “El Árbol de Neem *Azadirachta a Juss*”. Pasantía de Investigación (Barroeta 2005).

- ✓ Esta pasantía de investigación es una compilación bibliográfica de los aspectos más relevantes del árbol de Neem sus propiedades beneficiosas para la salud, también ahonda en la historia del cultivo de esta planta tanto en la India como en Venezuela. Las conclusiones más relevantes de este trabajo son:
- ✓ El árbol de Neem se debe valorar por sus ingredientes farmacéuticos y tiene la capacidad de afectar la vida diaria de mucha gente, médica, cultural, y socialmente.
- ✓ Con el uso creciente de los insecticidas sintéticos de amplio espectro, de rápida eficiencia y de aparente fácil aplicación como los organoclorados, organofosforados y carbonados, todos con distinta toxicidad para los seres vivos, así como el desarrollo de la medicina moderna en los países tropicales. Sin embargo, los efectos secundarios de los insecticidas sintéticos, han obligado a buscar otras alternativas que respeten la fauna y el medio ambiente en general, por ello, se debe explotar cada una de las propiedades del Neem como fuente de productos naturales.
- ✓ No cabe duda que los productos a base de Neem son alternativas verdaderas para los productos químicos que en el pasado y en la actualidad están causando muchos problemas.

II.3 “Extracción de la Nimbina de la semilla de Neem usando CO_2 y una mezcla de CO_2 -Metanol en condiciones supercríticas”. (Tonthubthimthong 2003).

Esta investigación se fundamenta en el uso del CO_2 como solvente y la ayuda de metanol como cosolvente. Los resultados cuantitativos para la extracción de la nimbina son de gran importancia para esta investigación y las conclusiones de mayor aplicación a este estudio son:

- ✓ La nimbina puede ser extraída exitosamente de la semilla de Neem usando CO_2 a condiciones óptimas (308 K, 20MPa y un flujo de CO_2 de $0,62 \text{ cm}^3/\text{min}$) produciendo un rendimiento de 85%.

- ✓ La extracción de la nimbina incrementó con el aumento del flujo de CO₂ y de la presión, a su vez disminuyó con el decremento de la temperatura y del tamaño de partícula.
- ✓ El metanol no parece ser un modificador efectivo del rendimiento de extracción de la nimbina, la adición de este cosolvente produce un incremento marginal y parece no tener valor cuantitativo, ya que encarece y dificulta el manejo y la separación de la muestra analizada. Se puede decir en general que el rendimiento aumenta con el incremento de la concentración de metanol y de la temperatura aunque no sea un incremento significativo.

II.4 “Formulación de insecticidas a base de azadiractin presente en el árbol de Nim”.
(Guerra 2001).

Las conclusiones más importantes de este trabajo, vinculadas a esta investigación son:

- ✓ Los insecticidas formulados a base de aceite de Nim tienen un costo menor en comparación con otros insecticidas químicos que se utilizan con el mismo objetivo.
- ✓ En definitiva, los insecticidas a base de Nim tienen características potenciales que pueden ser aprovechadas en pro del ambiente, debido a que son productos completamente naturales, que garantizan una alta eficiencia en el control de insectos, por sus efectos letales inhibidores de crecimiento, alimentación, reproducción y repelencia.
- ✓ Debido a su baja toxicidad los insecticidas de Nim pueden ser empleados masivamente para combatir las plagas estudiadas sin representar ningún daño para seres humanos.
- ✓ El aceite de Nim debe almacenarse a temperaturas que no excedan los 35°C para garantizar una mayor estabilidad del mismo.
- ✓ Los insecticidas de Nim ven reforzada su acción de letalidad cuando son combinados con insecticidas químicos.

II.5 “Comparación de procesos de extracción del aceite esencial de vetiver” (Armas y Corredor, 2007).

Se usaron raíces de vetiver para extraer su aceite esencial usando el método supercrítico y convencional con distintos solventes, las conclusiones más resaltantes son:

- ✓ En el proceso de extracción del *Aceite Esencial de Vetiver* no existe una relación directa entre la cantidad de solvente empleado y la cantidad del aceite extraído.
- ✓ La extracción supercrítica es la técnica que presenta mayores características semejantes al espectro patrón, determinado por la pureza de la muestra.
- ✓ La extracción con fluido supercrítico es el método que permite obtener un mayor rendimiento de Aceite Esencial de Vetiver, de segundo queda la destilación con solventes orgánicos, etanol, propanol y ciclohexano, en ese mismo orden y por último los métodos que usan agua como solvente, arrastre de vapor e hidrodestilación.
- ✓ Las técnicas de destilación con solventes orgánicos presentan mayores rendimientos que las técnicas que usan agua como solvente pero debido a los altos costos de producción únicamente deben ser aplicados a escala de laboratorio.
- ✓ La técnica que presenta una mayor oportunidad para una producción comercial del *Aceite Esencial de Vetiver* en el país es la de extracción con fluido supercrítico.

CAPÍTULO III

MARCO REFERENCIAL

III.1 EL ÁRBOL DE NEEM

El árbol del Neem (*Azadirachta Indica* A. Juss) es un árbol de hoja perenne tropical relacionado con la caoba. La denominación botánica del Neem es “Azederaque índico” que proviene del nombre persa, Azad-Darikth, cuyo significado es “el árbol libre”. (Guerra 2001).

El Neem taxonómicamente hablando, pertenece a la familia Meliaceae que incluye especies tan conocidas como la caoba (*Swietenia Mahogani*) y la violeta (*Melia Azaderach*). Entre los sinónimos más utilizados se encuentran: *Antalea Azadirachta*, *Melia azadiracta*, *Melia Indica*. Los nombres más comúnmente usados son: Neem, Margosa, Caoba criolla, Caoba haitiana, Árbol milagroso y Árbol farmacia.

III.2 CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS DEL ÁRBOL DE NEEM.

Originario del este de la India, se puede encontrar en gran parte del sureste asiático y África. Recientemente se han realizado plantaciones en el Caribe y varios países centroamericanos. Sobre campos abiertos, si las temperaturas no bajan más de 0°C puede alcanzar alturas de 15 a 20 metros. Se puede cultivar con precipitaciones fluviales bajas de hasta 400 mm por año y sobrevive a temperaturas que pueden alcanzar los 50°C. Estas plantas son capaces de llegar a vivir hasta 200 años. El mismo florece con pequeñas flores blancas que tienen un aroma dulce parecido al jazmín.

En general el árbol de Neem comienza a producir frutos entre los tres y cinco años de edad, un árbol desarrollado podrá dar hasta 50 kg. de fruto por año. El mismo es suave y carnoso en forma elipsoidal, de 1.2 a 2 cm de largo, conteniendo usualmente una semilla, éste es inicialmente verde y se vuelve amarillo conforme madura, cerca de 12 semanas después de la floración, como se observa en la Figura N° 1.



Figura N° 1: Hojas de Neem y Fruto en plena madurez. (Barroeta 2005).

El Neem tiene corteza moderadamente gruesa, con fisuras de color rojizo-castaño. Siempre está verde o amarillo, dependiendo del clima; los períodos de deshoje son normalmente breves, y ocurren durante las sequías prolongadas. Las hojas son alternas y compuestas, de 10 a 38 cm. y agrupadas al extremo de las ramas. El árbol produce muchas flores bisexuales, pequeñas, de dulce aroma, blancas o de color crema y florece la primera vez después de 3 años. Los árboles Neem son prolíficos productores de fruto, comenzando a los 3-5 años y se vuelven completamente productivos a los 10-12 años.

En zonas semiáridas el árbol de Neem, requiere precipitaciones anuales de 800 a 1800 mm para el crecimiento vegetativo óptimo. Necesita mucha luz y resiste altas temperaturas, pero es muy sensible al frío. Es excelente para siembras en zonas bajas, secas y húmedas.

El Neem prefiere los suelos profundos, permeables y arenosos, pero puede plantarse en una amplia variedad de tipos de suelo, incluyendo sitios difíciles donde la mayoría de otras especies no se desarrollan bien. Puede prosperar en suelos rocosos, secos, poco profundos e infértiles, pero no se recomienda para ciénagas barrosas o fangosas, suelos barrosos, salinos, o donde la sub-superficie sea dura.

Esta planta tampoco debe sembrarse donde los suelos se vuelvan empapados o temporalmente inundados. Prefiere un pH de suelo en el rango de 5.2 a 7.0, pero puede crecer dentro de un rango de pH de 5.0 a 8.0. Los árboles maduros de Neem demandan mucha luz, pero las plántulas toleran la sombra moderada durante su primera temporada de crecimiento, especialmente en sitios secos.

III.3 MECANISMO DE ACCIÓN DEL NEEM

Las propiedades del Neem están basadas en el parecido que presentan sus componentes con las hormonas reales, de tal forma que los cuerpos de los insectos absorben los componentes del Neem como si fueran hormonas reales y éstas bloquean su sistema endocrino. El comportamiento profundamente arraigado resultante y las aberraciones psicológicas, dejan a los insectos tan confundidos en su cuerpo y cerebro, que no pueden reproducirse y sus poblaciones se reducen mucho. (Montañez 2005).

Varios de los extractos obtenidos de las distintas partes del Neem, actúan sobre los insectos de diferentes maneras, tales como:

- ❖ Destruyendo o inhibiendo del desarrollo de huevos y larvas.
- ❖ Bloqueando la metamorfosis de las larvas.
- ❖ Destruyendo el apareamiento y comunicación sexual de los insectos.
- ❖ Repeliendo a las larvas y los adultos.
- ❖ Impidiendo a larvas poner huevos.
- ❖ Esterilizando adultos.
- ❖ Bloqueando la alimentación mediante la reducción de su habilidad para tragar (reduciendo la movilidad intestinal).
- ❖ Inhibiendo la formación de quitina (material del que se compone el esqueleto del insecto).
- ❖ Impidiendo que se realicen las mudas, necesarias para entrar en la siguiente etapa de desarrollo, de tal forma que actúa como regulador de crecimiento del insecto.

III.4 LA HOJA DE NEEM Y SU COMPOSICIÓN QUÍMICA.

Las hojas deben de obtenerse solamente de árboles cultivados orgánicamente o en su hábitat natural, lo anterior asegura tener el total de los elementos naturales de las hojas y así mismo se reduce el riesgo de contaminación por toxinas, es por esta razón que se ha decidido tomar como materia prima las hojas de Neem pertenecientes a la facultad de agronomía de la UCV, como se muestra en la Figura N° 2.



Figura N° 2: Hojas de árbol de Neem pertenecientes a la Facultad de Agronomía Universidad Central de Venezuela.

Las concentraciones mayores de ingredientes activos se encuentran en la semilla y el aceite, sin embargo la mayoría de estos también están en las hojas y la corteza en menores proporciones. En la Tabla N° 1 se pueden observar los compuestos que se encuentran en la hoja del árbol de Neem.

Tabla N° 1: Composición de las hojas de Neem. (Etcheverry, 2003)

Fibra	20%
Carbohidratos	50%
Proteínas	15%
Grasas	5%
Cenizas	8%
Calcio	2%

Las hojas de Neem poseen muchos componentes químicos, de especial interés son los terpenos, constituidos por C, H y O; la presencia de oxígeno hace esos compuestos más solubles en agua, metanol o etanol que en hexano, gasolina u otros solventes similares (Montañez 2005). Actualmente se conoce de la existencia de unos 100 terpenos. El más activo es la azadiractina, de la que existen varios tipos que varían desde la azadiractina A hasta la azadiractina K, de la cual posteriormente se hará una explicación más extensa.

III.5 USOS DEL NEEM

Entre los aspectos más importantes que justifican esta investigación se encuentran los diversos usos de la planta, a continuación se mencionan los más relevantes en diferentes áreas de aplicabilidad. (Etcheverry 2003)

III.5.1 *Contra la plaga:*

Uno de los ingredientes más efectivo como repelente de insectos que el químico usado mundialmente DEET (n,n,-diethyl-m-toluamide), del cual se sospecha puede causar cáncer en uso prolongado. Los extractos de Neem han sido aprobados por la EPA (Agencia de Protección del Ambiente de los E.U.A) para su uso como insecticida en cultivos alimenticios. Siendo no tóxico para las aves, animales de sangre caliente y humanos, puede proteger los cultivos de más de 200 especies de insectos.

III.5.2 *Medicinales:*

- ✓ **Psoriasis:** Los extractos de aceite y hoja de Neem son el remedio en el tratamiento de los síntomas de la psoriasis. Alivian el dolor y la comezón, reduciendo las escamas e inflamación en las áreas afectadas.
- ✓ **Diabetes:** Las dosis orales de extracto de hoja de Neem redujeron la necesidad de insulina entre un 30 y 50% para los pacientes con diabetes tipo I.
- ✓ **Sida:** Institutos de salud de varios países han reportado resultados muy prometedores de pruebas in vitro del Neem como agente anti viral contra el virus del Sida.
- ✓ **Cáncer:** Polisacáridos y Limonoides que se encuentran en la corteza, hojas y aceite del Neem, reducen los tumores y el cáncer sin efectos secundarios indeseables, lo anterior se apoya en varios estudios.
- ✓ **Enfermedades del corazón:** Los extractos de Neem tienen la capacidad de retardar la formación de coágulos en la sangre, combatir la arritmia, bajar los latidos del corazón elevados y la tensión arterial.
- ✓ **Herpes:** Pruebas realizadas en Alemania mostraron que los extractos de Neem son tóxicos para el virus del Herpes y producen un rápido alivio en la cura de las llagas.

- ✓ **Problemas Dentales:** Investigadores alemanes y americanos han afirmado que los extractos de Neem previenen las enfermedades periodontales.
- ✓ **Dermatología:** El Neem es altamente efectivo en el tratamiento del acné, caspa y verrugas.
- ✓ **Alergias:** Las propiedades antihistamínicas del Neem ayudan a inhibir las reacciones alérgicas, ya sea aplicado externamente o duodenales.
- ✓ **Ulceras:** Los extractos de Neem son de gran ayuda para reducir las molestias y sanar las úlceras gástricas y duodenales.

III.5.3 Punto de vista ecológico

El Neem tiene reputación de ser un purificador natural de aire, liberando oxígeno y manteniendo el nivel balanceado en la atmósfera.

III.5.4 Fuente de Madera

La porción de madera del centro es entre rojo y rojo castaño, mientras que la madera intermedia tiene un color amarillento-grisáceo o gris blanquecino. La madera es dura, durable, de opaca a algo lustrosa, aromática y resistente a los insectos y hongos. La madera seca con sólo un leve encogimiento, se aclimata bien y es fácil de trabajar, pero en la áspera y entrelazada fibra no coge un alto brillo. La madera aserrada de Neem es usada en la construcción ligera y para hacer vigas, marcos de puertas y ventanas, cajas, embalajes, carretas, ejes, yugos, estantes, paneles, botes, remos, cajas de puros, esculturas, juguetes, tambores, e instrumentos de labranza. También es usada para muebles, especialmente roperos, librerías y guardarropas, debido a que la madera repele los insectos.

Los árboles de Neem a menudo son manejados con sistemas de aclareo y poda o tala para producir pilares y postes. La madera redonda es también usada como leña y da muy buen carbón. A un contenido de humedad del 14%, la madera da un valor de energía de 16.92 megajoules/kg.

III.5.5 Mejoramiento del suelo

Después de extraer el aceite de las almendras, el material sobrante es llamado "Torta de Neem". Este producto ha sido usado por siglos a través de la India como mejorador de

suelo. La experiencia ha enseñado a los agricultores que si se incorpora esta torta al suelo de cultivo, producirá mejores y más grandes plantas y a la vez menos problemas con larvas.

III.6 ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales se definen, según la Organización Internacional de Estandarización (ISO) y la Asociación de Normativa Francesa, (AFNOR, 1998) como, “productos obtenidos a partir de una materia prima vegetal, bien por arrastre con vapor o agua, bien por procedimientos mecánicos a partir del epicarpio de las frutas cítricas, o bien por destilación seca. El aceite esencial se separa posteriormente de la fase acuosa por procedimientos físicos”.

El término de aceite esencial fue acuñado en el siglo XVI por Paracelso, conocido como el mejor alquimista, farmacéutico y químico de la Edad Media, significando con el término "esencia" una entidad inmaterial que impregnaba todo ser viviente e inanimado y que se compararía con el alma y los cuerpos divinos. El aislamiento de esa “esencia” debía de ser el fin último de la ciencia farmacéutica (Mazzani, 1973).

Se les llama aceites por su apariencia física y consistencia que es bastante parecida a los aceites grasos, pero se distinguen de ellos, porque al dejar caer unas gotas de esencia sobre el papel, éstas se volatilizan fácilmente sin dejar ninguna huella ni mancha grasosa (Gil Pavas et al., 2005). El nombre que se le asigna al aceite esencial es de acuerdo a la planta aromática de la cual se obtiene (Leupin, 2001).

Los aceites se forman en las partes verdes (con clorofila) del vegetal y al crecer la planta, éstos son transportados y se sitúan en los tejidos finos de la planta o en sacos, células, glándulas o conductos especiales encontrados en varias partes tales como flores, hojas, corteza, vástagos, semillas y raíces. La mayoría de los aceites ya existen mientras se extrae del material vegetal, pero algunos se forman únicamente como resultado de una reacción enzimática que se produce una vez que se hayan machacado o se hayan tratado especialmente los tejidos finos de la planta.

Se conocen alrededor de tres mil especies de plantas que producen cantidades significativas de aceites esenciales, incluso de algunas plantas se extrae más de un aceite esencial. Es

posible sin embargo, que todas las plantas sean capaces de producir alguna cantidad de aceites esenciales (Mazzani, 1973). Los aceites esenciales se encuentran ampliamente distribuidos en unas 60 familias de plantas entre las cuales se pueden mencionar las Compuestas, Labiadas, Lauráceas, Mirtáceas, Pináceas, Rosáceas, Rutáceas, Umbelíferas y las Gramíneas. (Cardenaz, 1997).

III.7 PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales son generalmente líquidos a temperatura ambiente y son sustancias muy volátiles. Por lo general no presentan coloración o son amarillo pálido, tienen una densidad inferior a la del agua y poseen un olor intenso característico extraordinariamente variable que constituye su característica más definida (Gil Pavas et al., 2005). En su gran mayoría son de olor agradable, aunque existen algunos de olor relativamente desagradable como por ejemplo los componentes que forman parte de la fracción aromática del ajo y la cebolla, los cuales contienen compuestos azufrados.

Son sustancias fácilmente alterables sensibles a la oxidación y tienen tendencia a polimerizarse dando lugar a la formación de productos resinosos, especialmente aquellas que contienen alcoholes terpénicos insaturados (auto oxidación), variando su olor, color y viscosidad. Presentan un índice de refracción elevado y son solubles en alcohol y en disolventes orgánicos habituales. Además son liposolubles, muy poco solubles en agua, y arrastrables por el vapor de agua.

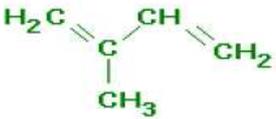
Las propiedades químicas de los aceites esenciales varían de acuerdo a la presencia de los principios activos de sus compuestos químicos, como lo son los alcoholes que tienen propiedades antisépticas y tonificantes; los aldehídos que tienen propiedades sedantes y antisépticas; los ésteres con propiedades fungicidas y sedantes; las cetonas, que ayudan a equilibrar la secreción mucosa; y los terpenos, que tienen propiedades antiinflamatorias y antisépticas. Por lo tanto, los aceites esenciales tienen algunas de las siguientes propiedades terapéuticas: antisépticas, antibacterianas, diuréticas, antiespasmódicas, sedantes, tonificantes, reequilibrantes, depurativas, antirreumáticas y afrodisíacas, entre otras.

III.8 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales son una compleja mezcla de sustancias químicas que en algunos casos puede superar los cien componentes. La mayor parte de éstos están compuestos de terpenos juntos con sustancias oxigenadas, aromáticos derivados del fenilpropano y otros compuestos diversos.

Los terpenos están formados por unidades isoprénicas que responden a la fórmula $(C_5H_8)_n$ cuyo número "n" sirve como criterio para la clasificación de los terpenos: monoterpenos (n = 2), sesquiterpenos (n = 3), diterpenos (n = 4) y triterpenos (n = 6). Los compuestos terpénicos presentes en las esencias son principalmente mono y sesquiterpenos y raramente diterpenos. Los terpenos pueden ser acíclicos, monocíclicos o bicíclicos (Gil Pavas et al., 2005). En la Tabla N° 2 se presentan los compuestos derivados de unidades isoprénicas que forman los terpenos, con su respectivo nombre y el número de átomos de carbono que los conforman.

Tabla N° 2. Compuestos Terpénicos (Armas y Corredor, 2007)

 <p>Isopreno (-metilbutan-1,3-dieno)</p>	Nombre	Unidades Isoprénicas	N° de átomos de carbono
	Monoterpenos	2	C ₁₀
	Sesquiterpenos	3	C ₁₅
	Diterpenos	4	C ₂₀
	Sesteterpenos	5	C ₂₅
	Triterpenos	6	C ₃₀
	Carotenoides	8	C ₄₀
	Resinoides	N	(C ₅) _n

Los compuestos oxigenados son aquellos a los cuales se les atribuye las grandes diferencias de olor observadas en varios aceites, siendo por lo general los que representan la porción más soluble del aceite, entre ellos se encuentran alcoholes, aldehídos, cetonas y ésteres, estos pueden ser saturados y no saturados, alifáticos y aromáticos, terpénicos y sesquiterpénicos. También pueden encontrarse fenoles, éteres fenólicos y ácidos (generalmente esterificados) (Matute, 1987). Algunos de estos compuestos se observan en la figura N° 3.

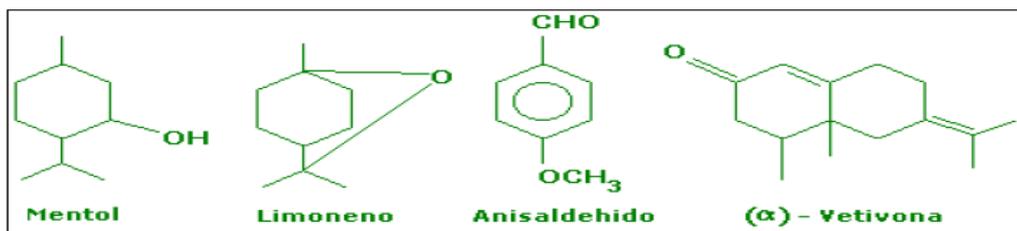


Figura N° 3. Compuestos oxigenados presentes en los aceites esenciales. (Armas y Corredor, 2007)

Entre otras sustancias que se pueden encontrar en pequeñas cantidades en los aceites esenciales se tienen ácidos orgánicos como, acético, valérico, isovalérico; cumarinas (bergapteno) y cetonas de bajo peso molecular.

III.9 CLASIFICACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales se clasifican en base a diferentes criterios como consistencia del aceite, origen o procedencia y naturaleza de los compuestos químicos mayoritarios entre otros. De acuerdo con su consistencia los mismos se dividen en fluidos, bálsamos y oleorresinas. Los fluidos son líquidos muy volátiles a temperatura ambiente, como, la esencia de menta, limón, y albahaca. Los bálsamos principalmente contienen sesquiterpenos y su consistencia es más viscosa o espesa, son poco volátiles y propensos a polimerizarse, como ejemplos se tiene, el bálsamo de copaiba, el bálsamo del Perú, bálsamo de benjuí, y bálsamo de Tolú.

Las oleorresinas tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas, como el caucho, gutapercha, oleorresinas de páprika, de pimienta negra, y de clavel, entre otras (Stachenko, 1998).

Según su origen se clasifican estos aceites como naturales, artificiales y sintéticos. Los naturales se obtienen directamente de la planta y no se someten posteriormente a ninguna modificación fisicoquímica; debido a su rendimiento tan bajo son costosos y variables en su composición.

Los artificiales se obtienen a través de los procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno de sus componentes principales, o son la mezcla de varias esencias naturales extraídas de distintas plantas, por ejemplo la esencia de anís enriquecida en anetol.

Los aceites esenciales sintéticos son mezclas de diversos productos obtenidos por medio de procesos químicos y se utilizan ampliamente en la preparación de sustancias aromatizantes y saborizantes, como las esencias de vainilla, limón, y fresa (Stachenko, 1998).

Desde el punto de vista químico, a pesar de su composición compleja los aceites esenciales se pueden clasificar de acuerdo a los componentes mayoritarios presentes. Los aceites esenciales ricos en monoterpenos se denominan aceites esenciales monoterpénicos, como el aceite de hierbabuena, albahaca y salvia. Los ricos en sesquiterpenos son los aceites esenciales sesquiterpénicos, como el aceite de copaiba, pino, junípero y vetiver. Los ricos en fenilpropanos son los aceites esenciales fenilpropanoides; por ejemplo el de clavo, canela y anís. Aunque esta clasificación es muy general resulta útil para estudiar algunos aspectos fisicoquímicos de los monoterpenos, los sesquiterpenos y los fenilpropanos, sin embargo existen clasificaciones más complejas que tienen en cuenta otros aspectos químicos.

Otra clasificación de interés de los aceites esenciales según su calidad se pueden clasificar en dos grandes grupos: los aceites esenciales crudos o de baja calidad y los aceites esenciales purificados o refinados que son de alta calidad. Entre estos dos grados se encuentran muchas calidades, pero en términos generales se puede decir que a los aceites esenciales crudos no se les ha agregado mayor valor y se utilizan como materia prima para velas, pebeteros, artículos de aseo y limpieza e incluso insecticidas, papelería o juguetería de plástico. Los aceites esenciales purificados o de alta calidad, tienen el mayor valor agregado y son utilizados en la industria alimenticia, farmacéutica, cosmética y de perfumes.

En base a los parámetros anteriormente expuestos el aceite esencial de Neem se clasifica según indica la tabla N° 3.

Tabla N° 3: Clasificación del aceite esencial de Neem.

Según su consistencia	Bálsamo.
Desde el punto de vista químico	Triterpénico.
Según su origen	Natural.
Según su calidad	Baja calidad.

III.10 COMPOSICION QUIMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE NEEM

El encontrar exactamente cómo actúa una planta medicinal y cuáles compuestos o combinación de compuestos la hacen actuar, es una tarea difícil. Estando constituida por cientos de ingredientes algunos activos otros no, las plantas son analizadas generalmente por sus ingredientes activos más potentes. Lo anterior se realiza aislando sistemáticamente cada ingrediente para determinar su estructura, esto demuestra a qué clase de químico pertenece y usualmente indica el tipo de efecto esperado en moléculas complejas. (Ramos 2004)

El aceite esencial de Neem dependiendo de la parte del árbol de donde haya sido extraído, tiene en mayor o en menor proporción una gama de ingredientes activos los cuales han sido identificados y otros no, los componentes más importantes son los llamados Triterpenos o limonoides, estos compuestos según su actividad y su concentración en el árbol, pertenecen a los 8 grupos básicos mostrados en la Tabla N° 4.

Tabla N° 4: Grupos terpénicos que se encuentran en el aceite esencial de Neem y lugar de la planta donde se encuentran en mayor proporción. (Ramos, 2004)

Azadirona	Se encuentra en el aceite que se extrae de las semillas
Amorastaitina	Aparece en las hojas frescas de Neem.
Vepinina	En el aceite de las semillas.
Vilasinina	En las hojas de Neem.
Nimbina	En las hojas y las semillas.
Nimbolina	También presente en las semillas.
Salanina	En las hojas y semillas.

Dentro de estos grupos los compuestos terpénicos más importantes existentes en el Neem se encuentra la azadiractina en todas sus variaciones, pero también otros triterpenos de igual importancia como son: nimbina, salanina, 6-desacetilnimbina, 3-desacetilsalanina, 3-tigliolazadirachtol, 3-acetil-1-tigliolazadirachtinina y la salaninolida. A continuación se tratarán la Azadiractina y la Nimbina que son los compuestos activos más importantes del Neem.

III.10.1 La Azadiractina.

Es un tetranotriterpenoide, cuya fórmula molecular es $C_{35}H_{44}O_{16}$ y representa el principio activo más importante del Neem. Este compuesto (Figura N° 4) no puede ser sintetizado en el laboratorio de manera artificial. Está constituido por al menos nueve isómeros estrechamente relacionados. Los tipos A y B de la azadiractina son los que se presentan en mayor cuantía. Se piensa que el 83% de la azadiractina natural es tipo A y el 16 % es de tipo B. El resto lo constituyen las variaciones de la C a la K. (Montañez 2005). La estructura molecular de la azadiractina se observa en la Figura N° 4.

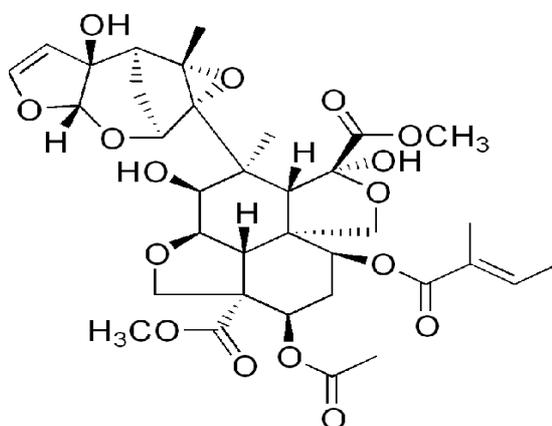


Figura N° 4: Estructura química de la Azadiractina. (Nagasampagi et al, 1995)

La azadiractina parece que actúa bloqueando la producción de ecdisoma, de esta forma altera el delicado equilibrio hormonal de los insectos, afectando a su metamorfosis. Las malformaciones producidas en cualquiera de los daños morfogénicos en adultos, como alas, aparato bucal mal desarrollado entre otros, provoca que los daños que puedan producir estos insectos se reduzcan ya que su actividad alimentaria se ve afectada, a su vez no pueden volar y se vuelven estériles muriendo rápidamente. Estos efectos se producen de forma combinada y con diferente grado de acción, dependiendo de la especie de insecto, de su estado de desarrollo, de la concentración del preparado y del proceso de extracción. (Guerra 2001).

Por tanto, la azadiractina es una materia activa de origen natural que resulta bastante eficaz, de hecho, es tan potente que una simple señal de su presencia previene a algunos insectos incluso de tocar las plantas. No obstante, se han mostrado algunas limitaciones

sobre todo debido a efectos de los rayos ultravioletas, los cuales aceleran la degradación de esta sustancia.

III.10.2 La Nimbina.

Tiene actividad antiviral. Es el componente primario de los principios amargos obtenidos cuando los gérmenes del Neem se extraen con alcohol. Causan efectos repelentes y antialimentarios. Afectan el virus X de la patata, el virus del Vaccinia y el virus del Pox de las aves. La estructura molecular de la Nimbina se puede observar en la Figura N° 5.

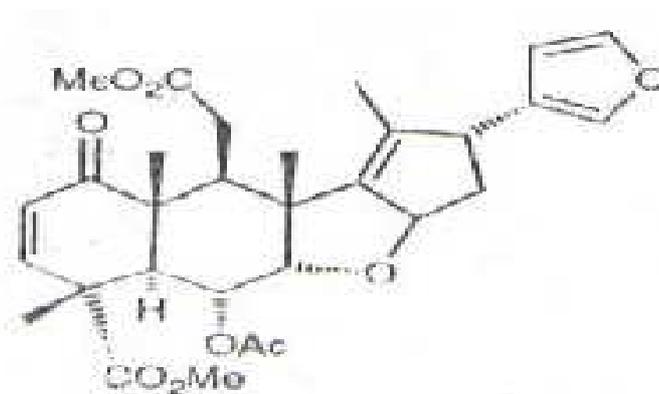


Figura N° 5: Estructura molecular de la Nimbina. (Guerra, 2001)

Es importante aclarar que los principales compuestos terpénicos que se encuentran en el aceite esencial de Neem son lípidos, y a pesar de que como se mencionó anteriormente actúan sobre el sistema nervioso central no se pueden clasificar como alcaloides, ya que como se observa en las estructuras moleculares de la azadiractina (Figura N° 4) y la Nimbina (Figura N° 5) las mismas carecen de grupos nitrogenados, que son los constituyentes principales de estas sustancias derivadas de los aminoácidos. El aceite esencial de Neem si posee algunos alcaloides aunque en muy poca cantidad, pero estos no representan los compuestos activos más importantes del mismo.

Entre los alcaloides más importantes del aceite esencial de Neem se encuentran la margosina y la azadarina.

III.11 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES.

La extracción de aceites esenciales modernamente requiere de procesos de separación que comúnmente estudia la Ingeniería Química y la Bioquímica. La separación se realiza debido a la transferencia por difusión de uno o varios componentes cuando dos fases se ponen en contacto. Por difusión se entiende el movimiento a escala molecular de componentes químicos dentro de una sustancia de una región de alta concentración a una de baja concentración (Garmendia et al., 2004).

En el área de tecnología de alimentos la extracción se define como la operación unitaria por la cual un componente de un alimento se separa o elimina mediante el contacto con otro material o fase que tiene mayor afinidad por él; mientras que el resto de los componentes permanecen en el alimento. Esta separación implica, por lo tanto, la existencia de dos fases, siendo el disolvente aquella que se añade al material original. Las dos fases pueden ser un sólido y un líquido, dos líquidos inmiscibles o un sólido o líquido y un gas; ésta es, además, la base de la clasificación de las operaciones de extracción. La extracción requiere tres pasos sucesivos: la mezcla de la materia prima con el disolvente, la separación de las dos fases después del contacto y la disminución de la cantidad de soluto contenido en el disolvente. La eficacia de la recuperación del disolvente, si su costo es elevado, es uno de los factores a considerar a la hora de determinar la viabilidad económica de la operación.

La selección de los métodos o técnicas de extracción de los aceites esenciales depende de las diferentes características del aceite como la volatilidad, cantidad presente del mismo, punto de ebullición de sus componentes y parte de la planta de procedencia; estos factores afectan la calidad y el rendimiento de la extracción, así como la estabilidad de sus compuestos sin alteraciones, ya que la mayoría tienden a degradarse cuando se someten a altas temperaturas o a otro tipo de tratamiento intenso. Los principales métodos utilizados para obtener aceites esenciales a partir de plantas aromáticas son la destilación, prensado, maceración, extracción con fluidos supercríticos y extracción con solventes orgánicos.

En la extracción se han de considerar los siguientes fenómenos físicos:

- ❖ La difusión del compuesto de interés desde el interior de la materia prima hasta su superficie y, de aquí, hacia el grueso de la fase del disolvente. Para ello es necesario

que, previamente, el disolvente penetre en el interior de la materia prima para arrastrar dicho componente. Su velocidad de difusión determinará el tiempo necesario para que se alcance el equilibrio entre las dos fases.

- ❖ La solubilidad del soluto que se desea extraer en el disolvente utilizado. Dado que la máxima concentración posible en el extracto final es la saturación del soluto, cuanto mayor sea ésta, menor será el número de ciclos necesarios para lograr el grado de separación deseado.
- ❖ El equilibrio de la concentración del soluto en la materia prima y en el disolvente, que requiere que ambos estén en contacto durante un tiempo adecuado.

El principal factor que controla la extracción es la velocidad a la que un componente (soluto) se transfiere desde la fase tratada (materia prima sólida o líquida) a la fase disolvente. Esta velocidad depende del coeficiente de transferencia de masa, el cual varía con las condiciones de la materia prima, del soluto en cuestión y del disolvente.

Otros factores que afectan a la velocidad de extracción son:

- ❖ El área de exposición o grado de contacto de la materia prima con el disolvente y la profundidad de penetración de éste último. La reducción del tamaño de partícula facilita la extracción, al aumentar el área de exposición y también disminuir la distancia que el soluto ha de migrar desde la materia prima hasta ponerse en contacto con el disolvente. El tamaño de partícula ha de controlarse, para que el flujo en el extractor no se reduzca en exceso.
- ❖ El gradiente de concentración del soluto entre la materia prima y el disolvente, que es la fuerza conductora de la extracción.
- ❖ La temperatura a la cual se realiza la operación. En general, al aumentar la temperatura se facilita la operación.
- ❖ La velocidad y las características del flujo del disolvente. Para mejorar la extracción conviene aumentar la velocidad de flujo del disolvente y que éste sea turbulento.
- ❖ La extracción más simple es la que se lleva a cabo en una etapa o contacto. Una etapa es una unidad del equipo en la que una o más fases se ponen en contacto, se mantienen así durante un período de tiempo en el que se produce la transferencia de

masa de una fase a otra hasta alcanzar un estado de equilibrio (no necesariamente termodinámico) y se separan mecánicamente.

Seguidamente, se procederá a explicar a detalle los métodos de extracción que son de interés para este trabajo especial de grado, como lo son el método de extracción convencional con agua o hidrodestilación, y el método extracción supercrítica.

III.12.1 EXTRACCIÓN CONVENCIONAL

La destilación es un proceso convencional para la extracción, y consiste en eliminar uno o más de los componentes de una mezcla volátil por medio de la transferencia simultánea de calor y masa. Para llevar a cabo la operación se aprovecha la diferencia de volatilidad de los constituyentes de la mezcla, separando o fraccionando éstos en función de su temperatura de ebullición. Se usa para concentrar mezclas alcohólicas y separar aceites esenciales así como componentes de mezclas líquidas que se deseen purificar.

La destilación con agua o hidrodestilación, es una de las técnicas más antiguas y simples usadas para la extracción de los aceites y grasas. En este método el material vegetal se pone en contacto con agua dentro de un recipiente o alambique, donde se calienta directamente hasta ebullición, permitiendo que la esencia contenida en la planta se desprenda por el calentamiento y forme una mezcla junto con el agua que se evapora. El vapor pasa a través de un conducto y llega a un sistema de enfriamiento, en el cual se condensa la mezcla, y luego a otro recipiente donde se recolecta el aceite líquido. La separación de la grasa del agua líquida se realiza, bien sea aprovechando la diferencia de volatilidad, o por diferencia de densidad entre las sustancias.

Los productos obtenidos mediante destilación en agua, normalmente presentan notas más fuertes y un color más oscuro con respecto a los producidos por otros métodos. En general se puede decir que los aceites extraídos por destilación en agua son de menor calidad que los extraídos por otros métodos, debido a las siguientes razones:

- ❖ Algunos componentes, como los ésteres, son sensibles a la hidrólisis, mientras que otros componentes, tales como los hidrocarburos monoterpénicos acíclicos o los aldehídos, son susceptibles de polimerización.

- ❖ Los compuestos oxigenados, tales como los fenoles, tienden a ser parcialmente solubles en el agua, hecho por el cual es imposible la remoción completa de estos compuestos.
- ❖ Los tiempos requeridos de destilación son demasiado largos, lo cual se asocia a un decremento de la calidad del aceite obtenido. Una ventaja de este procedimiento es que el costo involucrado para la fabricación del equipo es de los más bajos; además que su operación no requiere de servicios de energía eléctrica, vapor, aire u otros (Garmendia, 2004).

III.12.2 EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS.

Aparte de los métodos convencionales, se han de desarrollado varias técnicas para la extracción de solutos de matrices sólidas, tales como: la extracción asistida con ultrasonido, la extracción asistida con microondas, la extracción con solvente acelerado y la extracción con fluidos supercríticos, con el objeto de acortar el tiempo de extracción, disminuir el consumo de solvente, aumentar el rendimiento de extracción y mejorar la calidad del extracto (Velasco, 2007).

La extracción con fluidos supercríticos se puede definir como la operación unitaria que utiliza el poder solvente de determinadas sustancias, a temperaturas y presiones superiores a sus valores críticos. Se basa fundamentalmente en la capacidad que tienen determinados fluidos en estado supercrítico para modificar su poder solvente. Bajo estas condiciones, el fluido supercrítico se encuentra en un estado de agregación entre la fase líquida y gaseosa, con las siguientes características (Ordóñez, 1998):

- ❖ Una elevada densidad a alta presión, similar a la fase líquida. Por ello, actúan como excelentes solventes líquidos; cuanto mayor es la presión, más aumenta su capacidad solvente.
- ❖ Una alta difusividad, viscosidad relativamente baja y ausencia de tensión superficial, semejante a las propiedades del gas. Esto les confiere un excelente poder de penetración y de mezcla, así como una gran velocidad de transferencia de masa.

Un fluido supercrítico se define como un gas pesado con propiedades de líquido con un poder disolvente controlable. En otras palabras, es una forma de materia en la cual el estado líquido y gaseoso son indistinguibles; de esta manera el fluido se encuentra en un estado donde la materia es compresible y se comporta como un gas, ya que adquiere la forma del recipiente que lo contiene, sin embargo al mismo tiempo presenta la densidad típica de un líquido como también su característico poder disolvente (Tapia, 2005).

Cada sustancia presenta su propia región supercrítica, la cual se produce a partir de un punto denominado “punto crítico”; este punto es característico para cada sustancia, definiéndose en el diagrama de fases por una temperatura crítica (T_c) y una presión crítica (P_c). Para una sustancia, a T_c y P_c , la densidad del líquido y del gas es idéntica, tanto que las dos fases son indistinguibles. Sobre tal temperatura y presión, el líquido y el gas coexisten como una fase única. A esta región de presión y temperatura sobre P_c y T_c se le denomina región supercrítica como se muestra en el diagrama presentado en la Figura N° 6.

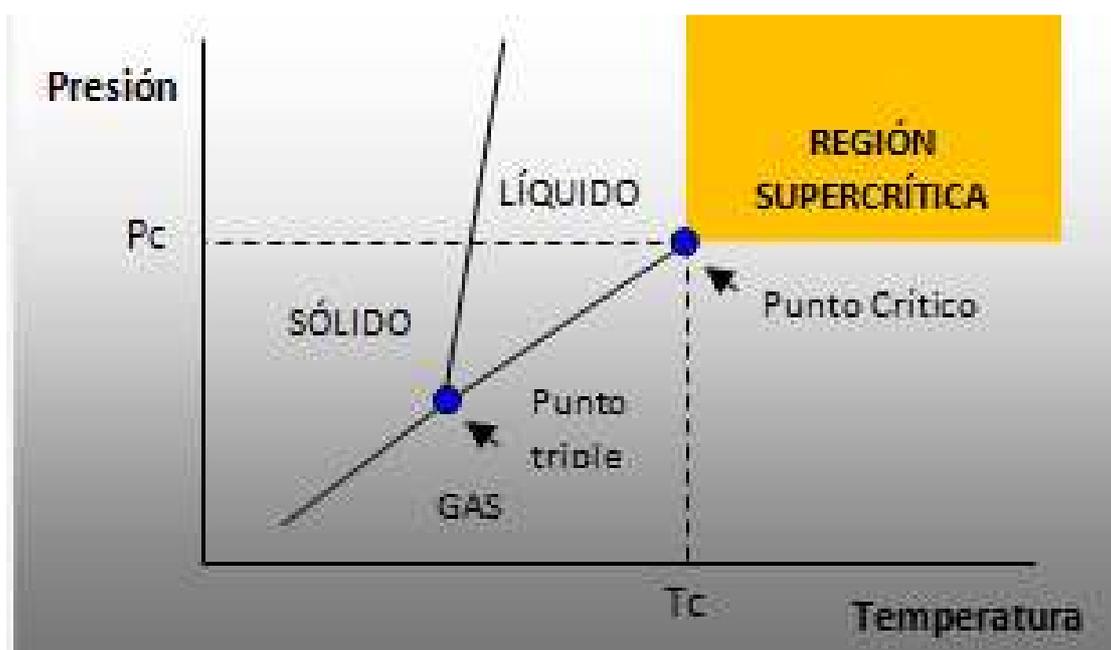


Figura N° 6. Diagrama presión-temperatura de una sustancia pura (Soledad, 2007)

En la industria de la extracción supercrítica existe una gran variedad de compuestos utilizados como solventes supercríticos. Algunos de ellos se presentan resumidos en la tabla N° 5, y se observa que el CO_2 posee constantes críticas relativamente fáciles de alcanzar.

Tabla N° 5: Propiedades de algunos solventes comúnmente usados en condiciones supercríticas
(Mukhopadhyay, 2000).

Fluido	Punto de ebullición normal (°C)	Presión crítica (bar)	Temperatura crítica (°C)	Densidad en el punto crítico (g/cm ³)
Dióxido de Carbono	-78,5	73,8	31,1	0,468
Etano	-88	48,8	32,2	0,203
Agua	100	220,5	374,2	0,272

Con la extracción supercrítica se obtienen altos rendimientos en recuperación de las grasas y además, muchas opciones para lograr y controlar la selectividad deseada, la cual es bastante sensible a variaciones en la presión y la temperatura.

Además, las bajas temperaturas no afectan químicamente los componentes de la grasa. Entre las limitaciones de esta técnica, figuran la extracción preferencial de sustancias oxigenadas y el alto costo en la inversión inicial, puesto que se requieren bombas y sistemas de extracción resistente a las altas presiones, haciendo el equipo requerido relativamente costoso (Gil Pavas y Sáez Vega, 2005).

III.13 VENTAJAS DEL USO DE CO₂ SUPERCRÍTICO COMO DISOLVENTE EN PROCESOS DE EXTRACCIÓN. (Pardo, 2005)

El CO₂ posee propiedades de naturaleza física que lo hacen la principal referencia a la hora de hablar de extracción supercrítica, entre sus principales ventajas se pueden citar:

- ❖ Constantes críticas bajas ($P_c = 7.38 \text{ MPa}$, $T_c = 304.15^\circ\text{K}$). Permite trabajar con bajas temperaturas de extracción aconsejables para productos termolábiles.
- ❖ Baja viscosidad, alta difusividad y baja tensión superficial.
- ❖ Elevado poder de extracción de compuestos orgánicos, dependiente de la densidad, fácilmente modificable por variación de P y T.
- ❖ Elevada velocidad de transferencia de materia.
- ❖ Permite obtener extractos de un elevado grado de pureza (el aroma, sabor, color y textura del producto extraído es similar al del producto original o "fresco").
- ❖ No inflamable, no reactivo, no tóxico y relativamente barato.

III. 14 COSOLVENTES.

Los cosolventes son sustancias de volatilidad intermedia con respecto al solvente y al soluto a ser extraído, y se agregan en una concentración mucho menor con respecto a la del solvente supercrítico (entre 1 y 5 % molar, inclusive hasta 10 % molar). Se adicionan con la finalidad de cambiar las características solventes, tales como el aumento de la polaridad y de las interacciones específicas, sin cambiar significativamente la densidad y la compresibilidad del solvente supercrítico original. (Soledad, 2007)

El cosolvente mezclado con el solvente supercrítico (para una composición particular), se vuelve supercrítico cuando su presión está por encima de la presión crítica de la mezcla, y cuando su temperatura está por encima de la temperatura crítica de mezcla, siendo estos valores críticos de mezcla muy parecidos a los valores críticos del solvente supercrítico puro. Para el etanol, una sustancia polar, la presión crítica es de 61,4 bar (890,3 psi) y la temperatura crítica es de 240,4 °C.

III.15 MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN QUÍMICA

Los métodos de caracterización química comprenden una serie de técnicas y procedimientos usados con la finalidad de identificar y cuantificar la composición química de una sustancia en estudio. Estos métodos permiten realizar análisis cuantitativos y cualitativos de la muestra, donde se identifica las sustancias de una muestra (análisis cualitativo) y se determina la cantidad o concentración de una determinada sustancia en la muestra (análisis cuantitativo). A continuación se explica de manera general, la técnica de caracterización utilizada en cada una de las muestras de este Trabajo Especial de Grado

1 Infrarrojo (Nakamoto, 1997)

Esta técnica se fundamenta en la absorción de la radiación IR por las moléculas en vibración. Una molécula absorberá la energía de un haz de luz infrarroja cuando dicha energía incidente sea igual a la necesaria para que se dé una transición vibracional de la molécula. Es decir, la molécula comienza a vibrar de una determinada manera gracias a la energía que se le suministra mediante luz infrarroja.

Pueden distinguirse dos categorías básicas de vibraciones: de tensión y de flexión. Las vibraciones de tensión son cambios en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos. Las vibraciones de flexión están originadas por cambios en el ángulo que forman dos enlaces.

La espectroscopia infrarroja tiene su aplicación más inmediata en el análisis cualitativo: detección de las moléculas presentes en el material. En la zona del espectro electromagnético IR con longitudes de onda del infrarrojo medio (entre 4000 y 1300 cm^{-1}) se suelen observar una serie de bandas de absorción provocadas por las vibraciones entre únicamente dos átomos de la molécula. Estas vibraciones derivan de grupos que contienen hidrógeno o de grupos con dobles o triples enlaces aislados. En la zona del espectro electromagnético IR con longitudes de onda comprendidas entre 1300 y 400 cm^{-1} (infrarrojo lejano), la asignación de las bandas de absorción a vibraciones moleculares es más difícil de realizar, debido a que cada una de ellas está generada por absorciones individuales sumadas (multiplicidad de las bandas). Es la denominada zona de la huella dactilar (flexión de enlaces CH, CO, CN, CC, etc.). En esta zona de longitudes de onda, pequeñas diferencias en la estructura y constitución de las moléculas dan lugar a variaciones importantes en los máximos de absorción.

CAPÍTULO IV

METODOLOGÍA.

A continuación se presenta el desarrollo sinóptico empleado en este Trabajo Especial de Grado para poder cumplir con los objetivos planteados previamente, así como también se da una explicación a fondo de los equipos utilizados. Posteriormente se explica a profundidad el procedimiento experimental usado para llevar a cabo cada una de las experiencias, tomando en cuenta el acondicionamiento del equipo, la operación del proceso y la recolección del extracto.

La metodología preliminar para cumplir los objetivos planteados fue la siguiente:

- ❖ Se realizó una revisión bibliográfica acerca del árbol de Neem, y más específicamente de las hojas, y del aceite esencial de hojas de Neem con el fin de conocer los métodos que se han utilizado para extraer esta esencia en particular.
- ❖ Se definió la materia prima como hojas de Neem secas provenientes de los sembradíos de la Facultad de Agronomía de la UCV en Maracay Estado Aragua.

Se realizaron pruebas preliminares con finalidad de estudiar los parámetros que pudiesen favorecer las pruebas de extracción supercrítica. Estas variables se discuten a continuación.

IV.1 PRUEBAS PRELIMINARES

Se realizaron dos experiencias con la finalidad de establecer todos los parámetros que pudiesen favorecer la investigación. Estas experiencias fueron el estudio del uso de un cosolvente y la influencia de la variación del tamaño de partícula al momento de la operación supercrítica. A continuación se detallan cada una de las etapas de esta primera sección de la investigación.

IV.1.1 Uso de un cosolvente

Para estudiar la factibilidad del uso de algún cosolvente se realizó una experiencia con etanol usando un montaje tipo Soxhlet para verificar el poder de solvencia de este compuesto sobre las hojas de Neem. Se procede a explicar detalladamente los pasos cumplidos en esta experiencia.

IV.1.1.1 Experiencia del montaje tipo soxhlet con etanol como solvente

Para la extracción con etanol del aceite esencial de hojas de Neem se realizó el montaje de los equipos en el Módulo III de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad Central de Venezuela. Todo el material utilizado se encontraba disponible en este mismo lugar.

Los eventos realizados para llevar a cabo la experiencia de extracción con etanol fueron:

- ✓ Se reunió el material y se acondicionaron los equipos (mantas eléctricas, material de vidrio, mangueras y líneas de proceso).
- ✓ Se realizó el montaje del equipo Soxhlet usando etanol como solvente en donde se efectuaron pruebas preliminares para la familiarización con el método, revisando parámetros como las conexiones del equipo, el estado inicial de los materiales, la calibración de las balanzas, la condición de la plancha de calentamiento y la dimensión adecuada del condensador para minimizar pérdidas de los compuestos más volátiles.
- ✓ Se estableció una carga inicial de 25 gramos de hojas de Neem para el método de destilación con etanol debido a que se aproxima a la capacidad del balón de destilación.
- ✓ Se estableció un tiempo de destilación 24 horas, según lo recomendado en la bibliografía (Armas y Corredor, 2007).
- ✓ Se trabajó en este método de destilación con una presión aproximadamente igual a una atmósfera.
- ✓ Se verificó el poder de solvencia del etanol con este método mediante el cálculo del porcentaje de rendimiento. El porcentaje de rendimiento se calculó en base a la diferencia entre la masa de las hojas antes del proceso de extracción, y la masa de las hojas después del mismo.

IV.1.2 Influencia de cortar las hojas en el equipo de extracción supercrítica.

- ✓ Para realizar esta experiencia se siguió el mismo procedimiento que se especificará para las experiencias de extracción supercrítica, solo que se cortaron las hojas en un tamaño mucho menor para estudiar si esto afectaba significativamente el porcentaje de rendimiento.

A continuación se explican los aspectos fundamentales de pruebas preliminares y de las dos experiencias realizadas en este Trabajo Especial de Grado, más adelante se estudiará con mayor profundidad cada una de estas experimentaciones.

IV.2 EXTRACCIÓN SUPERCRTICA USANDO CO₂ COMO SOLVENTE.

En la experiencia de extracción supercrítica para la obtención del aceite esencial de hojas de Neem se utilizó el equipo de extracción supercrítica que se encuentra en el Módulo I de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad Central de Venezuela.

Éste consta de dos equipos acoplados. El primer equipo se utiliza como zona de alimentación y presurización del CO₂ y en el segundo se realiza la extracción supercrítica del aceite esencial de Neem, a partir del contacto del CO₂ presurizado sobre las hojas de la planta.

Los eventos realizados para llevar a cabo la experiencia de extracción supercrítica usando CO₂ como solvente fueron:

- ✓ Se realizaron pruebas preliminares para familiarizar y garantizar el funcionamiento y la seguridad del montaje a realizar, mediante la revisión del estado de las tuberías del equipo, conexiones entre las mismas, así como se revisó la presión en la bombona de alimentación de CO₂ y las instalaciones eléctricas del sistema.
- ✓ Se acordó la masa inicial de alimentación de hojas de Neem, en el equipo de extracción de acuerdo a la máxima capacidad de operación del recipiente de extracción (50 gramos).
- ✓ En base a las condiciones del solvente se estableció la presión inicial de trabajo para garantizar que el mismo se encontrase en condiciones supercríticas en 1300 psi, y se estableció el tiempo de residencia fijo de 2 horas para cada una de las experiencias.

- ✓ Se repitió 2 veces más la experiencia anterior aumentando gradualmente la presión para 1600psig y 1900psig respectivamente, para así observar la variación del rendimiento con el aumento de la presión
- ✓ Manteniendo fija la presión correspondiente al máximo rendimiento (1900psig), se estudió la influencia de la temperatura mediante el aumento gradual de este parámetro. Se comenzó con 30°C seguidamente se trabajó con 45°C y finalmente con 60°C. Además se conservó la cantidad de materia prima y el tiempo de residencia con la finalidad de determinar el efecto de la temperatura sobre el rendimiento, selectividad y composición del extracto.

IV.3 EXTRACCIÓN CONVENCIONAL CON AGUA.

Para la extracción convencional con agua o hidrodestilación del aceite esencial de hojas de Neem se realizó el montaje de los equipos en el Módulo III de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad Central de Venezuela. Todo el material utilizado se encontraba disponible en este mismo lugar.

Los eventos para llevar a cabo la experiencia de extracción convencional con agua fueron:

- ✓ Se reunió el material y se acondicionan los equipos (mantas eléctricas, material de vidrio, mangueras, líneas de proceso, etc.).
- ✓ Se realizó el montaje del equipo de extracción convencional con agua o hidrodestilación en donde se efectuaron pruebas preliminares para la familiarización con el método, revisando parámetros como las conexiones del equipo, el estado inicial de los materiales, la calibración de las balanzas, la condición de la plancha de calentamiento y la dimensión adecuada del condensador para minimizar pérdidas de los compuestos más volátiles.
- ✓ Se estableció una carga inicial de 25 gramos de hojas de Neem para el método de destilación con agua debido a que se aproxima a la capacidad del balón de destilación.
- ✓ Se estableció un tiempo de destilación 24 horas, según lo recomendado en la bibliografía. (Armas y Corredor, 2007).

- ✓ Se trabajó en este método de destilación con una presión aproximadamente igual a una atmósfera.
- ✓ Se estudió la influencia del volumen del solvente en cuanto al rendimiento realizándose una prueba con 200 ml y posteriormente otra con 400 ml.

Por último se realizaron los siguientes procedimientos tanto a las muestras obtenidas en extracción supercrítica como a las obtenidas en la hidrodestilación:

- ✓ Se hizo un estudio analítico basado en espectroscopia de Infrarrojos, para determinar las composiciones de las sustancias químicas que en la misma se encuentran.
- ✓ Se compararon y analizaron los resultados de la Extracción Supercrítica y la Extracción Convencional con agua.

IV.4 DESCRIPCIÓN DEL EQUIPO Y DESARROLLO CRONOLÓGICO PARA LA PRUEBA PRELIMINAR DE EXTRACCIÓN CON ETANOL COMO SOLVENTE (Armas y Corredor, 2007).

IV.4.1 Descripción del equipo para la experiencia de extracción por arrastre de vapor de etanol como solvente.

El equipo de destilación con etanol consta de tres secciones principales; la sección de calentamiento y generación de vapor, la de extracción y la de condensación. Se presenta la descripción del equipo según la figura N°7, donde se muestra el diagrama del equipo con su nomenclatura correspondiente.

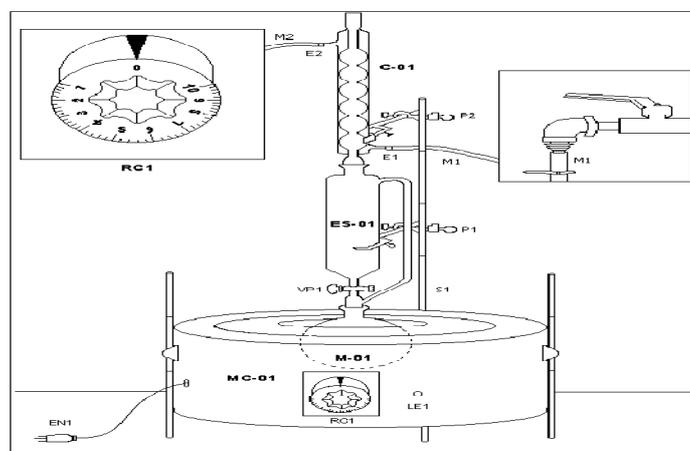


Figura N°7: Diagrama del equipo de extracción convencional con etanol. (Armas y Corredor, 2007).

El proceso de destilación del aceite esencial de hojas de Neem se realiza de manera continua en la sección de extracción que consta de un extractor tipo Soxhlet ES-01, donde se introducen las hojas de Neem. Este extractor posee una válvula (VP-1) que permite el paso tanto del vapor como del líquido que se condensa, formando una mezcla de solvente y aceite esencial. En la parte superior del extractor se tiene la sección de condensación constituida por un condensador vertical (C-01) con dos espigas E1 y E2, para la entrada y salida del líquido de enfriamiento mediante las mangueras M1 y M2. En el fondo se tiene la sección de generación de vapor que está formado por un matraz (M-01), de 500 mililitros, donde se introduce el etanol a utilizar, dicho balón se coloca sobre una manta de calentamiento (MC-01) que posee un regulador de calentamiento (RC1) y una luz que indica el encendido del equipo (LE1). Sobre la manta de calentamiento se levanta un soporte S1, con el fin de asegurar el montaje del equipo, donde se mantiene fijo el extractor tipo Soxhlet (ES-01) con la pinza P1 y el condensador vertical con otra pinza P2.

IV.4.2 Desarrollo cronológico de la experiencia de extracción convencional usando etanol como solvente.

IV.4.2.1 Acondicionamiento del equipo

- ✓ Se lavó y secó el material de vidrio que usó, en especial el extractor tipo Soxhlet (ES-01); tomando en cuenta que fue manejado con cuidado para evitar romperlo.

- ✓ Se pesaron 25 gramos de hojas de Neem en la balanza del laboratorio y se introdujeron en el extractor tipo Soxhlet.
- ✓ Se midieron 200 ml de etanol con la ayuda de un cilindro graduado.
- ✓ Se introdujo en el matraz (MC-01) el etanol a usar. Y se agregaron aproximadamente 5 perlas de ebullición para que se mantuviera en movimiento el líquido a destilar y se controlara la ebullición disminuyendo las burbujas.
- ✓ Se conectaron mangueras para la entrada y salida del agua de enfriamiento en el condensador vertical sobre las espigas del mismo. Posteriormente se conectó la manguera de entrada M1 en la espiga inferior E1, y la de salida M2 en la espiga superior E2. Luego en el otro extremo se conectó la manguera de entrada M1, a la tubería de agua, y la de salida M2 se conectó sobre el desagüe del laboratorio. Se aseguraron las mangueras en todas las conexiones con arandelas de plástico para evitar fugas o desprendimiento de las mangueras por la presión.
- ✓ Se realizó el montaje del equipo, colocando el matraz (M-01) sobre la manta de calentamiento (MC-01). Se unió el extractor Soxhlet (ES-01) al matraz (M-01) con un poco de lubricante en la conexión para facilitar la unión y evitar fugas de vapor. Se colocó sobre el extractor el condensador vertical (C-01) colocando un poco de lubricante en la conexión. Se Aseguró el equipo con las pinzas de soporte P1 y P2 sobre el extractor y sobre el condensador, sujetas al soporte de la manta de calentamiento (S1).

IV.4.2.2 Operación del equipo

- ✓ Se abrió la llave de agua para garantizar la entrada del líquido al condensador, que permitió el enfriamiento del vapor que se arrastra. No se abrió demasiado la llave para evitar que la presión pudiese originar una ruptura o desprendimiento de las mangueras.
- ✓ Se conectó y encendió la manta de calentamiento (MC-01). Fijando una velocidad de calentamiento determinada en el regulador (RC1).

- ✓ Se dejó el proceso de la destilación continua durante 24 horas para obtener una cantidad significativa del aceite esencial. Se aseguró que se produjo el calentamiento mediante la observación del etanol ebullente.

IV.4.2.3 Descarga del extracto

- ✓ Luego de las 24 horas se apagó la manta de calentamiento y se cerró la llave de servicio de agua que permitía la condensación del vapor. Se dejó enfriar y se desmontó tanto el condensador vertical como el extractor Soxhlet.
- ✓ Se removieron las hojas del extractor tipo Soxhlet y se lavó este equipo.

IV.5 DESCRIPCIÓN DEL EQUIPO Y DESARROLLO CRONOLÓGICO PARA LAS PRUEBAS DE EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA USANDO CO₂ COMO SOLVENTE. (Armas y Corredor, 2007).

IV.5.1 Descripción del equipo para el método de extracción con CO₂ como solvente en condiciones supercríticas.

La extracción supercrítica se realiza en un montaje como se muestra en la Figura N° 8. Éste equipo consta de tres secciones principales: una sección de alimentación y presurización de CO₂, una segunda sección donde se lleva a cabo la extracción y una última sección donde se realiza la separación del solvente y la grasa.

En la sección de alimentación está una bombona de dióxido de carbono (B-01), en estado líquido, a una presión de 900 psi (61,2 atm) y a 25°C aproximadamente. Esta bombona posee una válvula de aguja (V-01), que permite la alimentación del CO₂ líquido al sistema mediante una tubería de acero inoxidable 316 de ¼". En la sección de presurización se encuentra un recipiente presurizado (RP-01), o autoclave de forma cilíndrica, con una capacidad de 2 litros, hecho de acero inoxidable 316 que aguanta presiones de hasta 4500 psi (306,2 atm).

Este recipiente o autoclave está rodeado por una resistencia de calentamiento eléctrica de 4,5 Kw que posee un regulador e indicador de temperatura (TI-01). El recipiente RP-01, posee en el tope un manómetro tipo Bourdon (PI-01), donde se puede leer la presión dentro

del mismo. Para la comunicación de la sección de alimentación a la de presurización se tiene una válvula de aguja (V-02) y una válvula check ubicada antes de la entrada del recipiente de presurización RP-01.

En la línea de salida del recipiente presurizado (RP-01) se encuentra instalada una válvula (V-03), que permite el paso del CO₂ al equipo de extracción, así como una válvula de alivio (V-04) para mantener el recipiente en una presión adecuada para mantener la seguridad del sistema.

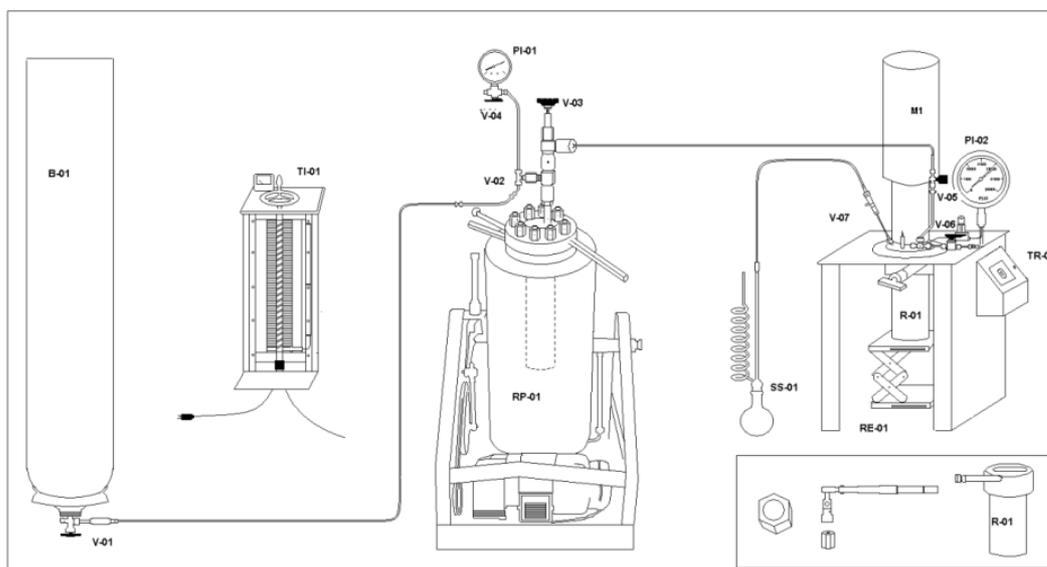


Figura N° 8. Diagrama del equipo de extracción con fluido supercrítico.(Armas y Corredor, 2007)

La sección de extracción consiste de un equipo o reactor (RE-01), que soporta presiones de hasta 2000 Psi contenido en un recipiente de aluminio (R-01) de 700 mililitros de capacidad, que posee un sello hermético. En el tope del equipo se encuentra una válvula (V-05) que permite regular la entrada del gas. Además, hay un manómetro tipo Bordón (PI-02), que mantiene la lectura de la presión dentro del recipiente donde ocurre la extracción.

Para la salida del reactor se cuenta con una válvula (V-07), donde pasa el aceite esencial y el solvente, de la sección extracción a la sección de separación, a través de una tubería de acero inoxidable 316 de 1/4". El equipo cuenta además, en el tope, con un sistema de venteo de dióxido de carbono al medio ambiente, para mantener la seguridad del proceso, que se controla mediante una válvula de alivio (V-06)

Finalmente, en la sección de separación (SS-01), se recupera la grasa extraída mediante la conexión con el equipo de extracción, y se separa del CO₂ gaseoso. Éste componente del equipo se une a la sección de extracción mediante la conexión de la tubería de acero inoxidable 316 de ¼” a la válvula de salida (V-07) del equipo de extracción hacia un balón, donde se produce la recuperación del aceite esencial. Este tubo o sección de separación se sumerge durante la experiencia en un baño de hielo seco y agua para producir la condensación de la grasa. En esta sección, el CO₂ se libera al ambiente.

IV.5.2 Desarrollo cronológico de la experiencia de extracción supercrítica.

IV.5.2.1 Acondicionamiento del equipo

El montaje del equipo implicó la correcta conexión de la bombona de dióxido de carbono a la línea de presurización, compuesta por la tubería de acero inoxidable 316 de ¼” y del recipiente de presurización. El acondicionamiento del equipo consistió en la realización de pruebas de fugas en las conexiones del montaje para mantener la seguridad y evitar pérdidas de la esencia. Además comprendió el correcto proceso de presurización que permite alcanzar las condiciones necesarias para trabajar en el rango supercrítico del dióxido de carbono.

El montaje del equipo se realizó únicamente cuando se preparó por vez primera todo el proceso para la extracción supercrítica para comprobar la seguridad de las experiencias a realizar. El procedimiento fue el siguiente:

- ✓ Se verificó que la válvula V-01 de la bombona de dióxido de carbono B-01 se encuentre cerrada.
- ✓ Se realizó la conexión de la tubería de acero 316 de ¼” al recipiente de presurización (RP-01).
- ✓ Se verificó que la válvula de entrada (V-02) del recipiente presurizador (RP-01) se encuentre cerrada, así como la válvula de salida (V-03) y la válvula de alivio (V-04).
- ✓ Se realizó la conexión de la tubería de acero 316 de ¼” de la salida del recipiente presurizador a la entrada del equipo de extracción supercrítica.

- ✓ Se colocó el recipiente de extracción (R-01) vacío en el equipo (RE-01) mediante el uso del soporte que se encuentra en el fondo del equipo y se selló herméticamente con el dispositivo que éste posee.
- ✓ Se abrió lentamente la válvula de aguja (V-01) de la bombona de CO₂ y luego la válvula de entrada del recipiente presurizado V-02 hasta que se estabilizó la presión dentro del recipiente, dicha estabilización fue verificada mediante la lectura en el manómetro (PI-01) y se realizó a una presión aproximadamente igual a 850 psi.
- ✓ Se cerró la válvula de aguja (V-01) de la bombona de CO₂, también la válvula de salida V-07 del equipo de extracción (RE-01), así como la válvula de alivio V-06.
- ✓ Se abrió la válvula de salida del recipiente presurizado (V-03) y la válvula de entrada (V-05) del equipo de extracción supercrítica, y se esperó hasta que se estabilizara la presión en el equipo.
- ✓ Se comprobó que no existieran fugas en el sistema usando líquido jabonoso alrededor de las conexiones del gas y en aquellas partes donde se pudiera filtrar el gas hacia el exterior.

IV.5.2.2 Operación del equipo

Una vez realizado el acondicionamiento y montaje se procede a la realización de la experiencia donde se extrae el aceite esencial. El procedimiento fue el siguiente:

- ✓ Se verificó que la presión del recipiente de presurización (RP-01) es de 0 psi.
- ✓ Se abrió el recipiente de presurización aflojando las tuercas que posee con ayuda de un torquímetro. Seguidamente se cargó el recipiente con aproximadamente 1 kilo y medio de hielo seco, para aumentar la presión del sistema.
- ✓ Se cerró rápidamente el recipiente de presurización, colocando las tuercas en su lugar original.
- ✓ Se abrió la válvula de aguja (V-01) y la válvula de alimentación de CO₂ al sistema (V-02), y se esperó hasta que la presión se estabilizara para posteriormente cerrar la válvula V-01.
- ✓ Se encendió la resistencia de calentamiento, y se ajustó a la temperatura de trabajo.
- ✓ Se colocaron las hojas de Neem facilitando que el CO₂ supercrítico tuviera un mayor área de contacto las mismas.

- ✓ Se introdujeron las hojas al recipiente de extracción (R-01) y se calzó el recipiente en el equipo (RE-01) mediante el soporte que se encuentra en el fondo del equipo.
- ✓ Se procedió a sellar herméticamente el recipiente con el dispositivo que éste posee para asegurar que no hubiesen fugas en la extracción. Asimismo se verificó que las válvulas de salida del equipo V-06 y V-07 estuviesen cerradas.
- ✓ Se esperó a que se alcanzara una presión de aproximadamente de 2300 psi en el recipiente presurizado (RP-01), para abrir la válvula de salida V-03 y la de entrada del equipo de extracción supercrítica (V-05). Para posteriormente esperar que se estabilizara la presión.
- ✓ Se dejó el proceso estable durante dos horas para que se produzca la extracción del aceite esencial de hojas de Neem
- ✓ Se preparó un baño de hielo para sumergir el balón de separación del aceite. El mismo se recolectó en dicho balón, mientras que el dióxido de carbono se liberaba al ambiente. Se conectó la tubería de acero inoxidable al balón de separación y se aseguro que no existiesen fugas con ayuda de pegamento de silicón.
- ✓ Se cerró la válvula de entrada del equipo de extracción (V-05).
- ✓ Se sumergió el balón de separación (SS-01) en el baño de hielo.
- ✓ Se abrió lentamente la válvula de salida (V-07) del equipo de extracción y se empezó a descargar el contenido del equipo de extracción. Como la expansión de CO₂ causaba que se congelara la tubería de descarga con un secador de aire caliente se procedió a calentar para que no se afectara la velocidad de descarga del extracto.

IV.5.2.3 Descarga del extracto

Una vez que concluye el tiempo de contacto de la matriz vegetal con el solvente en estado supercrítico se toman algunas precauciones a la hora de descargar el equipo y a continuación se explica el procedimiento utilizado:

- ✓ Se descargó todo el contenido del equipo de extracción, hasta que la presión en el manómetro del equipo (PI-02) fuera de 0 psi.
- ✓ Se arrastró el aceite contenido dentro del capilar de descarga con una inyectora llena de agua destilada.
- ✓ Se almacenó el aceite extraído en frascos de color ámbar para su análisis posterior

- ✓ Se retiró el recipiente de extracción del equipo (R-01), y se pesaron las hojas que contenía.
- ✓ Se lavó el recipiente de extracción del equipo (R-01).
- ✓ Se despresurizó todo el sistema abriendo las válvulas correspondientes de salida del gas.

IV.6 DESCRIPCIÓN DEL EQUIPO Y DESARROLLO CRONOLÓGICO CORRESPONDIENTE A LAS PRUEBAS DE EXTRACCIÓN CONVENCIONAL CON AGUA. (Armas y Corredor, 2007).

IV.6.1 Descripción del equipo en la destilación con agua.

La experiencia se realiza en el balón o matraz M-01 de la Figura N° 9, donde se introducen las hojas de Neem a destilar, junto con agua destilada que actúa como solvente extractor.

Sobre el matraz se coloca un condensador vertical (C-01) que posee dos espigas (E1 y E2) para la entrada y salida del agua de enfriamiento mediante las mangueras M1 y M2. El calor necesario para la destilación se produce en una manta de calentamiento donde se coloca el balón o matraz (M-01) con las hojas y el agua. El calor de la manta se controla mediante un regulador del calentamiento (RC-01) que esta posee. Todo el montaje se asegura a una pinza (P1) conectada al soporte de la manta para asegurar el material.

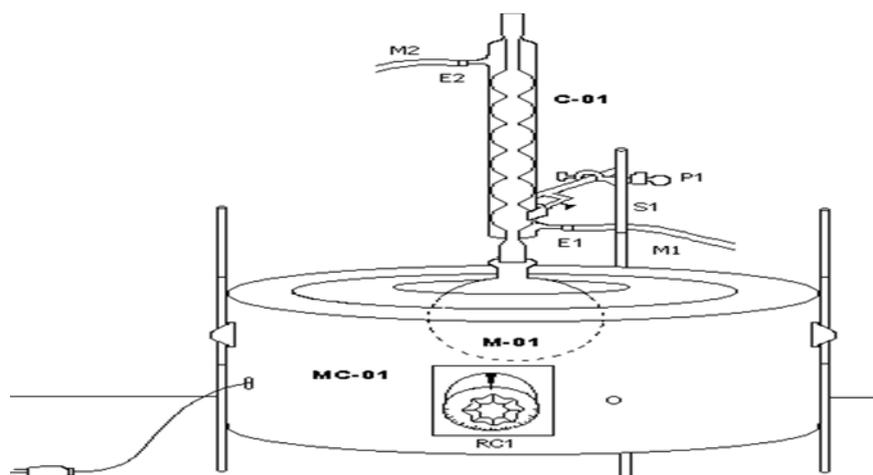


Figura N°9: Diagrama del equipo de destilación con agua. (Armas y Corredor, 2007)

IV.6.2 Desarrollo cronológico de la experiencia de extracción convencional con agua o hidrodestilación.

IV.6.2.1 Acondicionamiento del equipo

Para cada una de las experiencias de hidrodestilación previo al montaje del equipo se realizó el siguiente procedimiento experimental

- ✓ Se lavó y secó el matraz M-01.
- ✓ Se pesaron 25 gramos de hojas de Neem en la balanza del laboratorio.
- ✓ Se introdujeron las hojas dentro del matraz M-01.
- ✓ Se midió en un cilindro graduado la cantidad de agua destilada a usar en cada destilación, y seguidamente se introdujo el agua destilada en el matraz M-01.
- ✓ Se introdujeron al matraz M-01 perlas de ebullición.
- ✓ Se conectaron las mangueras para la entrada y salida del agua de enfriamiento en el condensador vertical sobre las espigas del mismo es decir, la manguera de entrada M1 en la espiga inferior E1, y la de salida M2 en la espiga superior E2. Luego en el otro extremo se conectó la manguera de entrada M1, a la tubería de agua, y la de salida M2 sobre el desagüe del laboratorio. Se aseguraron las mangueras y todas las arandelas de plástico para evitar fugas o desprendimiento de las mangueras por la presión.
- ✓ Se colocó el matraz (M-01) sobre la manta de calentamiento (MC-01). Sobre el matraz se colocó el condensador vertical (C-01) con un poco de lubricación. Seguidamente se aseguró el condensador vertical al soporte (S1) que posee en su parte inferior la manta de calentamiento con la ayuda de la pinza P1.

IV.6.2.2 Operación

Una vez que se asegura que todos los pasos contenidos en la sección anterior fueron ejecutados correctamente se procedió según lo siguiente:

- ✓ Se abrió la llave de agua para garantizar la entrada del líquido al condensador, que permite el enfriamiento del vapor que se arrastra. No se abrió demasiado la llave ya que la presión podía originar una ruptura o desprendimiento de las mangueras.

- ✓ Se enchufó y se puso en marcha la manta de calentamiento fijando una velocidad de calentamiento determinada.
- ✓ Se dejó el proceso de la destilación durante 24 horas continuas. Se aseguró el calentamiento mediante la observación del agua ebullente.
- ✓ Se apagó la manta de calentamiento luego de las 24 horas de destilación. Se cerró la llave de servicio de agua que permitía la condensación del vapor para después dejar enfriar el montaje y desmontar el condensador vertical.

IV.6.2.3 Descarga del equipo.

Para descargar el equipo simplemente se separó la suspensión hojas-agua y posteriormente las hojas se pusieron en la estufa para secarse, para finalmente ser pesadas con la menor cantidad de solvente remanente.

CAPÍTULO IV

PRESENTACION Y ANALISIS DE LOS RESULTADOS.

En este capítulo se presentan los resultados y las características más relevantes de la investigación durante la ejecución de las experiencias. En primer lugar se hablará sobre las consideraciones generales relacionadas con cada experimento, luego se explicarán los pasos necesarios para poner a tono los equipos de ambas pruebas, para luego hacer el análisis cualitativo de las muestras obtenidas mediante la caracterización por espectroscopia de infrarrojos. Paralelamente se estudiarán los porcentajes de rendimiento obtenidos y se hará un análisis cuantitativo de los extractos y se analizarán las ventajas de cada uno de los métodos estudiados. Finalmente se discutirán propiedades físicas de las muestras obtenidas como la densidad y el índice de refracción.

IV.1 CONSIDERACIONES GENERALES

La experimentación explicada en la metodología tanto para las pruebas de extracción supercrítica como para las de extracción convencional se llevó a cabo según lo explicado en el capítulo anterior. Las muestras obtenidas fueron guardadas en viales color ámbar y tapadas, enumeradas y refrigeradas, para posteriormente ser llevadas a caracterizar en base a la espectroscopía de infrarrojos. En base a estos análisis se llevó a cabo la caracterización cualitativa de las muestras obtenidas en cada experiencia. Estas muestras se resumen en la tabla N°6 que se presenta a continuación explicando de manera breve las condiciones de operación y el método de extracción utilizado para obtener cada una de ellas.

Tabla N°6: Muestras obtenidas durante cada experiencia y parámetros de operación

MUESTRA N°	TIPO DE EXTRACCION	PRESION (psi)	TEMPERATURA (°C)	SOLVENTE	COSOLVENTE
1	ESC	1300	ambiente	CO ₂	no
2	Hidrodestilación (200ml)	14,7	100	Agua	no
3	Soxhlet	14,7	ambiente	Etanol	no
4	ESC	1300	ambiente	CO ₂	Etanol
5	ESC	1301	ambiente	CO ₂	agua
6	Hidrodestilación (400ml)	14,7	100	Agua	no
7	ESC	1900	ambiente	CO ₂	no
8	ESC (hojas cortadas)	1900	ambiente	CO ₂	no
9	ESC	1600	ambiente	CO ₂	no
10	ESC	1900	30	CO ₂	no
11	ESC	1900	45	CO ₂	no
12	ESC	1900	60	CO ₂	no

Esta tabla resume todas las experiencias realizadas donde se debe señalar que las muestras 3, 4, 5 y 8 fueron obtenidas dentro de lo que fueron las pruebas preliminares. Asimismo, vale la pena resaltar que el número de muestras no representa el orden en que fueron realizadas las pruebas, se colocaron estos números de muestra en el momento en que las mismas fueron enviadas a analizar.

IV.2 PREPARACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LOS EQUIPOS.

El equipo que presentó mayores problemas de puesta en marcha y correcto funcionamiento fue el equipo de extracción supercrítica, ya que el mismo al trabajar

con alta presión presentaba varias fugas que primero debieron ser localizadas para posteriormente encontrar la manera de que las mismas fueran depuestas. Para empezar, la válvula de descarga del equipo (V-07) fue removida por una nueva, así como se tuvo que soldar el empalme de tubería desde el autoclave (RP-01) hasta el recipiente de contacto (R-01). También fueron cambiadas en su totalidad las arandelas de caucho de los empalmes de las tuberías de mayor diámetro, por unas de teflón sólido a fin de que el equipo pudiera soportar las presiones necesarias para la investigación.

Las tuberías de menor diámetro fueron destapadas y en algunos empalmes metálicos fueron sustituidos conos de cobre por conos de acero inoxidable, todo a fin de maximizar la operación del equipo y minimizar la posibilidad de fugas. El autoclave (RP-01) se pintó, ya que el mismo poseía mucho óxido a los laterales y fueron engrasadas las tuercas superiores para facilitar el deslizamiento de las mismas, además se hizo una limpieza del equipo y sus alrededores debido a que éste se encontraba en muy mal estado.

La resistencia de calentamiento (TI-01) Tenía los cables inferiores de alimentación eléctrica desconectados, lo que ocasionaba que no funcionara la misma, estos cables fueron reconectados y se verificó que la resistencia funcionara correctamente. Por último se cambió la bombona de dióxido de carbono (B-01) ya que la que tenía el equipo se encontraba parcialmente vacía.

La forma como se realizaron las experiencias que involucraban aumento de temperatura fue con la ayuda de una plancha de calentamiento y un beaker de 1000 ml, el mismo se llenaba de agua y calentaba el recipiente (R-01) en baño de María, en el agua se colocó un termómetro y mediante la lectura del mismo se controlaba la temperatura de manera manual, para que la misma fuera lo más constante posible. Este montaje se muestra en el Anexo E.

En cuanto al equipo relativo a las experiencias de hidrodestilación fue necesario cambiar el condensador (C-01) por uno de mayor longitud, para maximizar la condensación y retorno de los vapores de ebullición al balón donde estaba la matriz y el agua destilada. Así mismo fueron reemplazadas las oxidadas abrazaderas de metal y las mangueras rotas, por nuevas abrazaderas de plástico y mangueras de goma respectivamente. Por último fue reemplazado el tapón de goma de unión del balón (M-01) con el condensador (C-01) ya que el mismo se encontraba agrietado y daba fuga de los vapores generados en estas experiencias.

IV.3 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS OBTENIDAS

El análisis cuantitativo del porcentaje de rendimiento se calculó por diferencia de masas entre las hojas antes de ser sometidas a algún proceso de extracción y las hojas secas después del mismo. El procedimiento analítico donde se calcula el porcentaje de rendimiento y el resumen de todos los valores calculados se especifican en el Anexo C.

En cuanto a la caracterización de los espectros de infrarrojo, dado que no se disponía de una muestra patrón de aceite esencial de Neem extraído de hojas se decidió utilizar la técnica de espectroscopía infrarroja para estudiar los grupos funcionales más importantes de cada espectro y comparar las variaciones de composición de estos grupos al modificar el tipo de Extracción y cambiar las condiciones de operación.

Es preciso resaltar que el contenido del extracto al momento de ser enviado a analizar va mezclado con una gran cantidad de solvente o sustancia de arrastre, por este motivo el analista del equipo de infrarrojos tratando de eliminar precisamente ese solvente, es posible que haya eliminado pequeñas proporciones de los compuestos más volátiles del aceite. Por esta razón es muy probable que sólo se puedan observar las bandas características de los elementos más pesados en los espectros presentados a continuación. Se debe tener en cuenta también que la intensidad de la banda en la

mayoría de los casos representa una idea de la proporción que tienen estos grupos funcionales dentro de cada muestra.

IV.3.1 Análisis de las muestras obtenidas en el estudio de la influencia del uso de agua y etanol como cosolventes.

Dentro de las pruebas preliminares se consideró la posibilidad de que un cosolvente pudiera ayudar al CO₂ en las pruebas de extracción supercrítica, para tal fin se estudió la viabilidad de usar etanol puesto que el mismo es un alcohol de menor punto de ebullición, menor densidad y que debería poder tener mayor poder de solvencia que el agua. Para cuantificar este supuesto se procedió según la metodología IV.1.1.1 y se verificó el poder de solvencia del Etanol ya que en esta prueba se alcanzó un rendimiento de 24,33%



(a)

(b)

Figura N° 10: Experiencia tipo soxhlet en un tiempo inicial (a) y luego de las 24 horas requeridas por el método (b)

Como se observa en la figura N°10 el etanol demostró un alto poder de solvencia para la experiencia tipo soxhlet, no sólo por haber eliminado el color verde de las mismas como se puede apreciar en la Figura N° 10 (b), sino que además las hojas quedaron con una textura áspera y quebradiza. Por esta razón se procedió al estudio del uso de este solvente, como cosolvente en el equipo de extracción supercrítica.

Para analizar cualitativamente esta muestra se presenta en la figura N° 11 el espectro obtenido para esta experiencia.

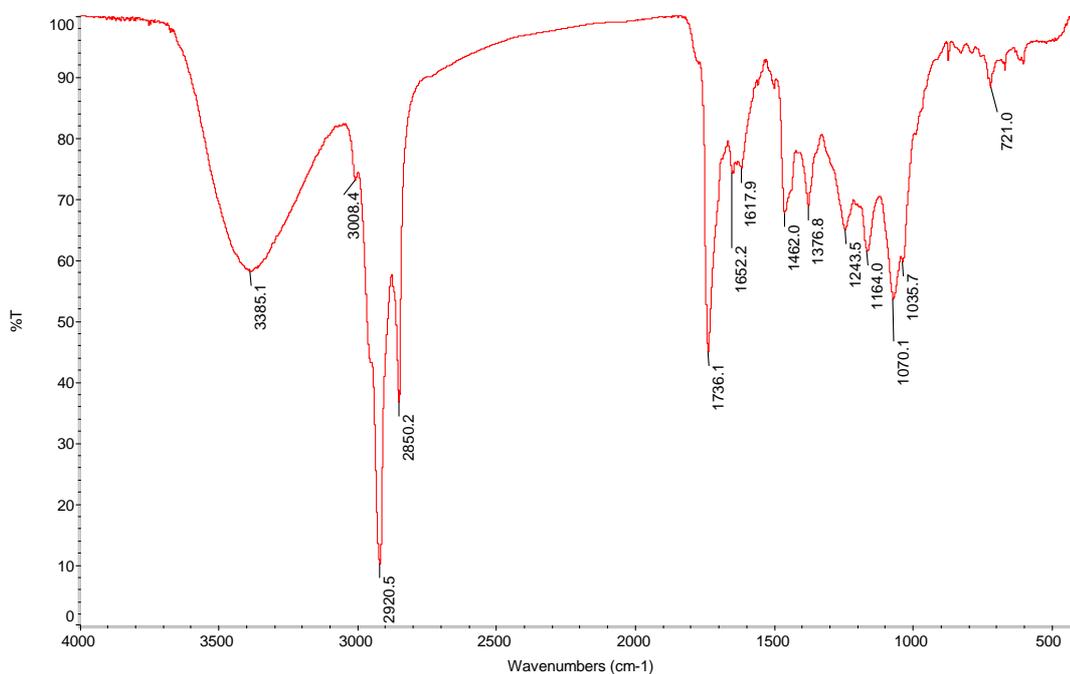


Figura N°11: Espectro infrarrojo de la prueba realizada con el montaje tipo soxhlet usando 200ml de Etanol como solvente.

En este espectro se observa en primer lugar que la inflexión de 3385.1 cm^{-1} indica la presencia de un enlace O-H que indica la presencia de etanol, asimismo el pico más pronunciado de todo el espectro se encuentra en 2920.5 cm^{-1} que indica la presencia de un carbono saturado de enlaces carbono- hidrógeno. Posteriormente se encuentra un pico de 1736.1 cm^{-1} que indica la presencia de aldehídos alifáticos. Seguidamente

se hace visible la presencia de éteres en la banda de 1070.1cm^{-1} . La presencia de este pico demuestra que los aldehídos son los grupos funcionales de mayor presencia en este extracto. Estas señales presentes en el espectro, en conjunto con el rendimiento alcanzado llevaron a que se realizara la experiencia de extracción supercrítica con etanol como cosolvente.

Para realizar la experiencia de extracción supercrítica con etanol como cosolvente se humedecieron las hojas de Neem con este solvente y luego se introdujeron al equipo de extracción supercrítica usando la misma masa de hojas y el mismo tiempo de residencia dentro del equipo de extracción.

La presencia de etanol ocasionó una fuerte obstrucción en la tubería de descarga del equipo, debido a que como se mencionó antes el etanol parecía endurecer las hojas y pequeñas partículas de las hojas se alojaban a lo largo del pequeño diámetro del capilar de descarga, ocasionando que dentro del balón de descarga (SS-01) fueran expulsadas con violencia pequeños trozos de hojas de Neem este fenómeno se puede observar en la Figura N° 12. La obstrucción dentro del capilar, hizo que se alargara el tiempo de descarga del equipo hasta por 3 horas.



Figura N°12 Obstrucción del equipo de extracción supercrítica usando etanol como cosolvente.

El rendimiento alcanzado en esta experiencia fue de 7,90% y debido a los inconvenientes operacionales causados por la obstrucción mostrada en la Figura N°12 se decidió estudiar la posibilidad de usar agua como cosolvente, para así observar la influencia de la misma en el proceso de extracción y la diferencia de acción del agua como cosolvente con respecto a lo que serían las pruebas de hidrodestilación.

Análogamente a lo que se hizo con el etanol, se humedecieron las hojas de Neem con agua destilada y posteriormente se introdujeron dentro de recipiente de contacto usando igualmente el mismo tiempo de residencia y la misma cantidad de hojas (aproximadamente 50 gr). El rendimiento obtenido para esta experiencia fue de 8,31%. Para esta experiencia aunque en menor proporción se presentó el problema de obstrucción de la tubería de descarga, asimismo se observó que al parecer la mayoría del aceite extraído quedaba sobre las hojas y sólo muy poca cantidad podía salir por la tubería o capilar de descarga. Este fenómeno es mostrado en la Figura N°13



Figura N°13: Hojas remanentes de la extracción supercrítica usando agua como cosolvente.

Para estudiar la composición de los extractos obtenidos se muestra la figura N° 14 donde se comparan ambos espectros de infrarrojo.

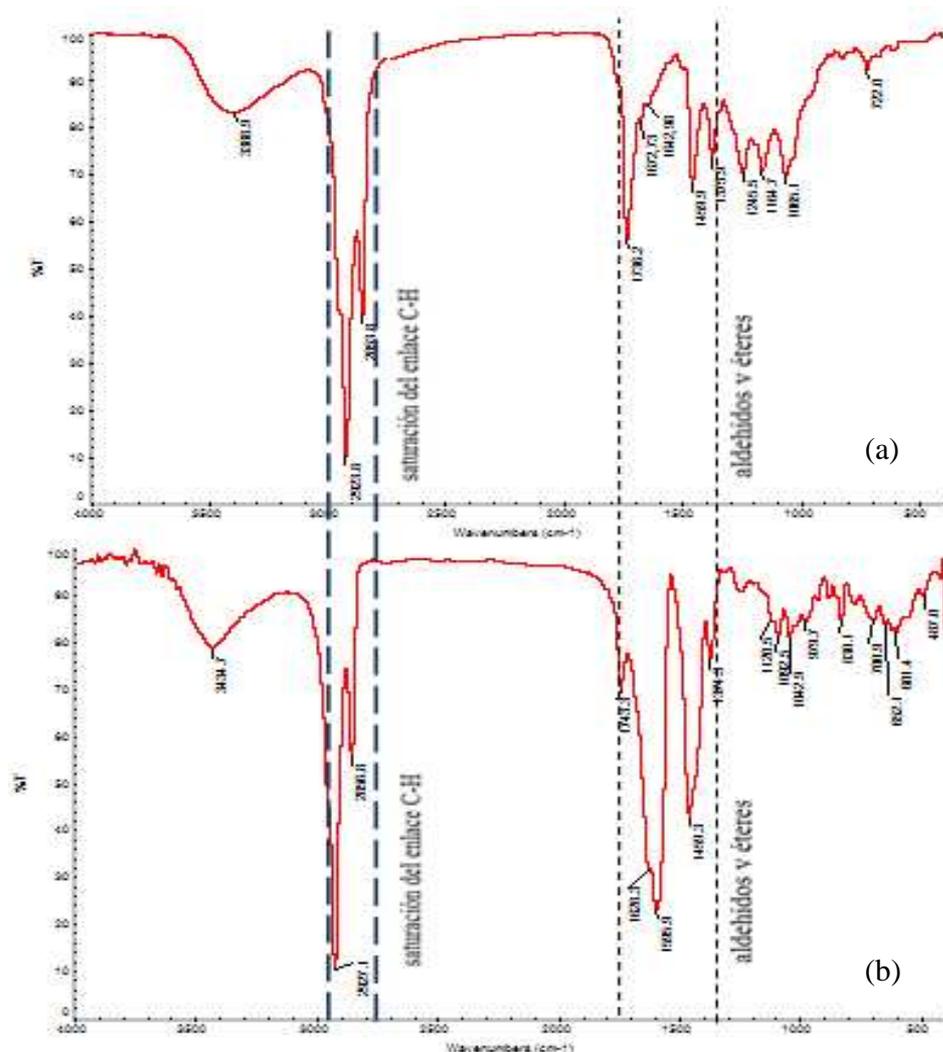


Figura N°14: Comparación de los espectros obtenidos en las experiencias de extracción supercrítica usando etanol (a) y agua (b) como cosolvente.

Se puede distinguir una diferencia significativa en lo que son ambas experiencias realizadas con cosolvente, reflejadas en los espectros infrarrojos de la figura N°14. En la región comprendida entre 1750 cm^{-1} y 1450 cm^{-1} , a pesar de que se realizaron las experiencias a las mismas condiciones de operación, la realizada con etanol mostró ser más selectiva hacia los aldehídos y la realizada con agua mostró el patrón característico de los éteres.

La diferencia cualitativa de las muestras no se reflejó en el análisis cuantitativo, ya que el incremento del porcentaje de rendimiento en las experimentaciones realizadas con agua y etanol en ninguno de los casos fue mayor al 1%. Esto, aunado a la gran cantidad de problemas de operatividad causados al equipo de extracción supercrítica hizo que se tomara la decisión de no trabajar con cosolvente para las experiencias posteriores de incremento de presión e incremento de temperatura usando CO₂.

IV.3.1 Análisis de las muestras obtenidas en el estudio de la influencia de disminuir el tamaño de las hojas de Neem.

Para llevar a cabo esta experiencia se cortaron las hojas de Neem y se introdujeron dentro del equipo de extracción supercrítica para comparar si existía un incremento significativo del porcentaje de rendimiento sobre este supuesto. El rendimiento obtenido para esta experiencia fue de 24,42% pero al igual que en la experiencia de la influencia del uso de un cosolvente se produjeron inconvenientes operacionales que en menor grado generaron una tendencia al aumento del tiempo de descarga del equipo, lo que se tradujo en una obstrucción del capilar, que aumentaba considerablemente el tiempo de descarga. Asimismo la obstrucción de esta delgada tubería involucraba el posterior destape y la limpieza de las mismas.

Al comparar el rendimiento obtenido en la muestra N° 7 (23,39%) que corresponde a las mismas condiciones de operación sobre las hojas sin cortar, se tiene que existe un pequeño incremento de 4,21% al cortar las hojas. Para ver la influencia cualitativa en ambas muestras se presenta la Figura N° 15.

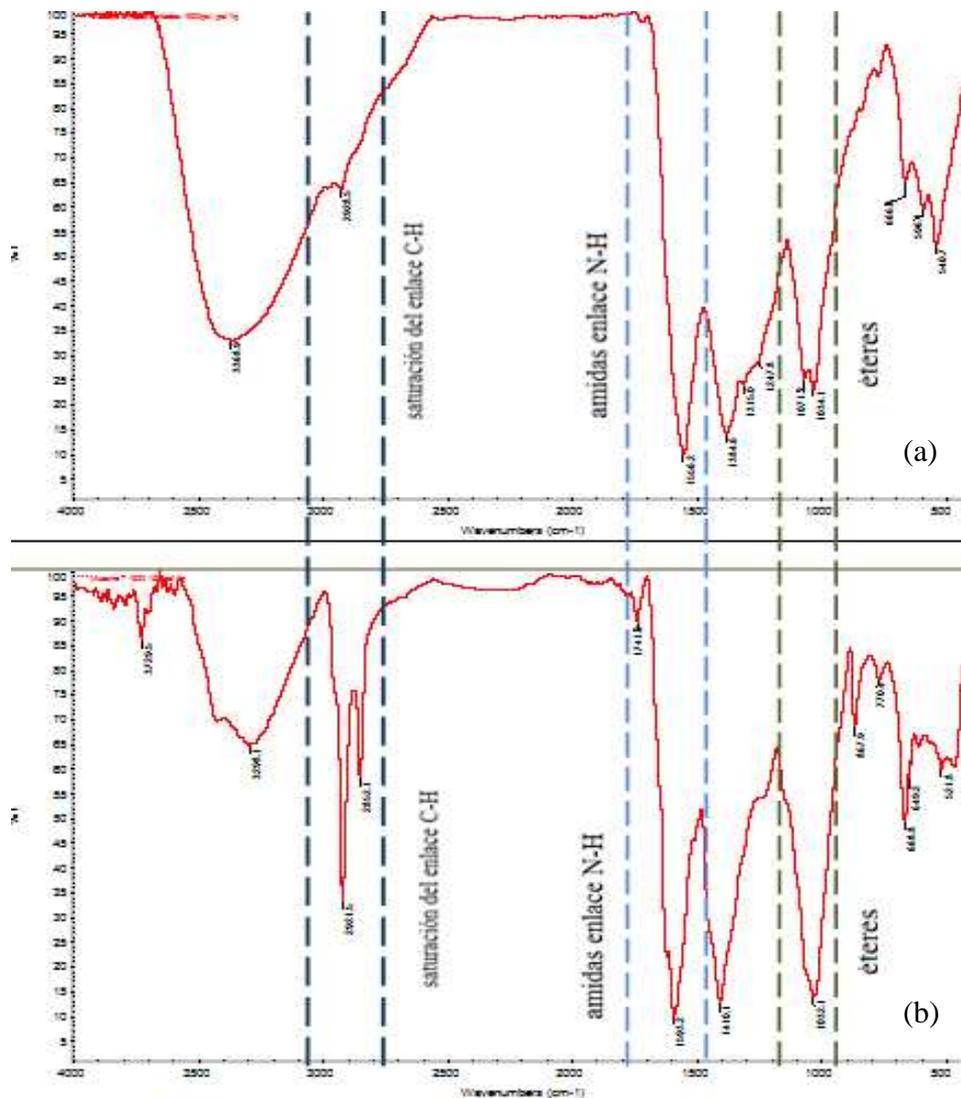


Figura N°15: Comparación de los espectros obtenidos en las experiencias de extracción supercrítica cortando las hojas (a) y con las hojas sin cortar (b).

En estos espectros se pueden observar intensidades de señal comunes, la diferencia fundamental reposa sobre el espectro mostrado en la parte inferior de la figura, correspondiente a la experiencia de las hojas sin cortar, ya que contrario a lo que se esperaba, el extracto correspondiente a las hojas sin cortar presentó una definición mayor en las señales características. Es por esta poca variación en los espectros de infrarrojos entre ambas experiencias, así como por el poco incremento alcanzado del

porcentaje de rendimiento, aunado a la cantidad de inconvenientes operacionales involucrados comentados anteriormente que se decidió trabajar con las hojas sin cortar para todas las experiencias posteriores de extracción supercrítica.

IV.3.3 Análisis de las muestras obtenidas en la extracción supercrítica correspondientes al incremento de la presión.

Una vez estudiados los factores que pudiesen favorecer el rendimiento de las experiencias de extracción supercrítica, como son el uso de un cosolvente y la influencia de disminuir el tamaño de las hojas, se realizaron las experiencias de incremento de presión. Para llevar a cabo estas experiencias se procedió según lo acordado en la metodología y se hizo un incremento gradual de esta variable que comprendió el estudio de 1300 psi para posteriormente trabajar con 1600 psi y finalmente terminar con 1900 psi.

Vale la pena destacar que la presión óptima de trabajo para estas experiencias fue tomada en base al porcentaje de rendimiento como se dijo anteriormente. El análisis cualitativo se usó para verificar la composición de cada muestra y la diferencia entre cada una de las mismas.

En primer lugar se llevo a cabo la experiencia correspondiente a la muestra N° 1 en donde se obtuvo un rendimiento de 7,36%. Para analizar cualitativamente esta muestra se caracterizará el espectro de infrarrojo de esta experiencia y seguidamente se evidenciará en una figura comparativa la influencia del incremento de la presión sobre la composición del aceite esencial de Neem extraído de las hojas de esta planta.

La Figura N°16 muestra el espectro de infrarrojo para la experiencia de extracción supercrítica usando CO₂ a temperatura ambiente y a una presión de 1300 psi.

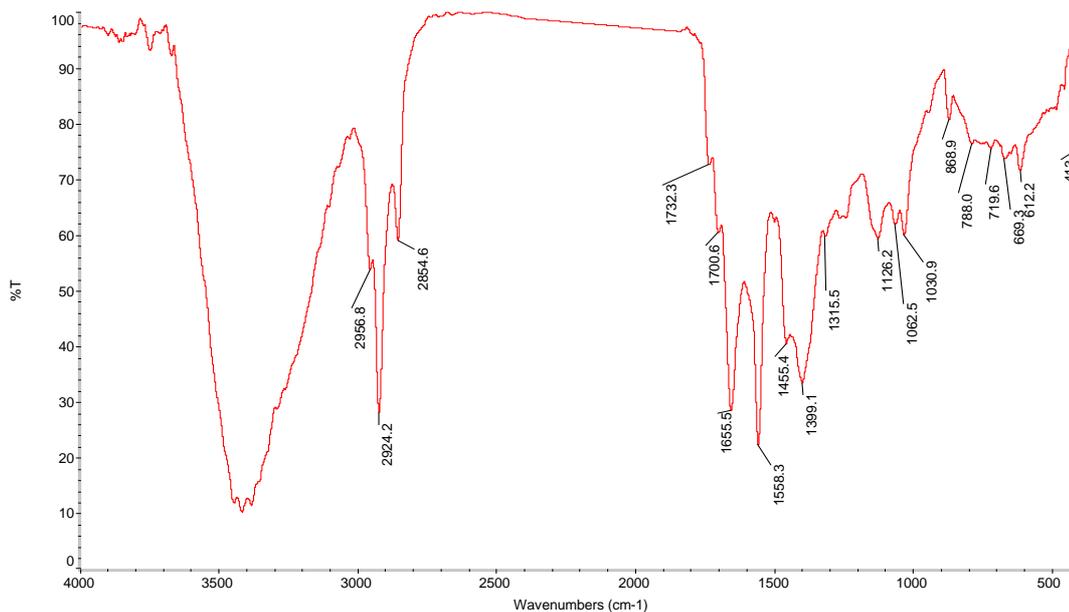


Figura N°16: Espectro infrarrojo de la prueba de Extracción Supercrítica trabajando a 1300 psi y a temperatura ambiente.

En la figura N° 16 se observan varias inflexiones de significancia entre las que se pueden mencionar la cercana a 3500 cm^{-1} que simboliza el enlace O-H del medio de transporte seleccionado para arrastrar el extracto retenido en el capilar de descarga. Seguidamente se observa un pico significativo en 2924.2 cm^{-1} que se puede asociar al de 1399.1 cm^{-1} que señala la presencia de enlaces carbono-hidrógeno saturado correspondiente a los grupos de alcanos o alquenos constituyentes de los grupos funcionales del aceite esencial de Neem. Seguidamente se observa un pico en 1655.5 cm^{-1} que sugiere la presencia de grupo amido y la existencia de la tensión del enlace C=O y el pico siguiente de 1558.3 cm^{-1} indica la presencia de una amida mono sustituida. Entrando a la zona de huella digital del espectro se observan inflexiones que indican la posible presencia de éteres, y a lo largo de toda esta región se evidencia la presencia de enlaces C-H.

Una vez caracterizada esta muestra la Figura N°17 señala a continuación la influencia del incremento de la presión sobre las bandas características más definidas mostradas en el espectro anterior.

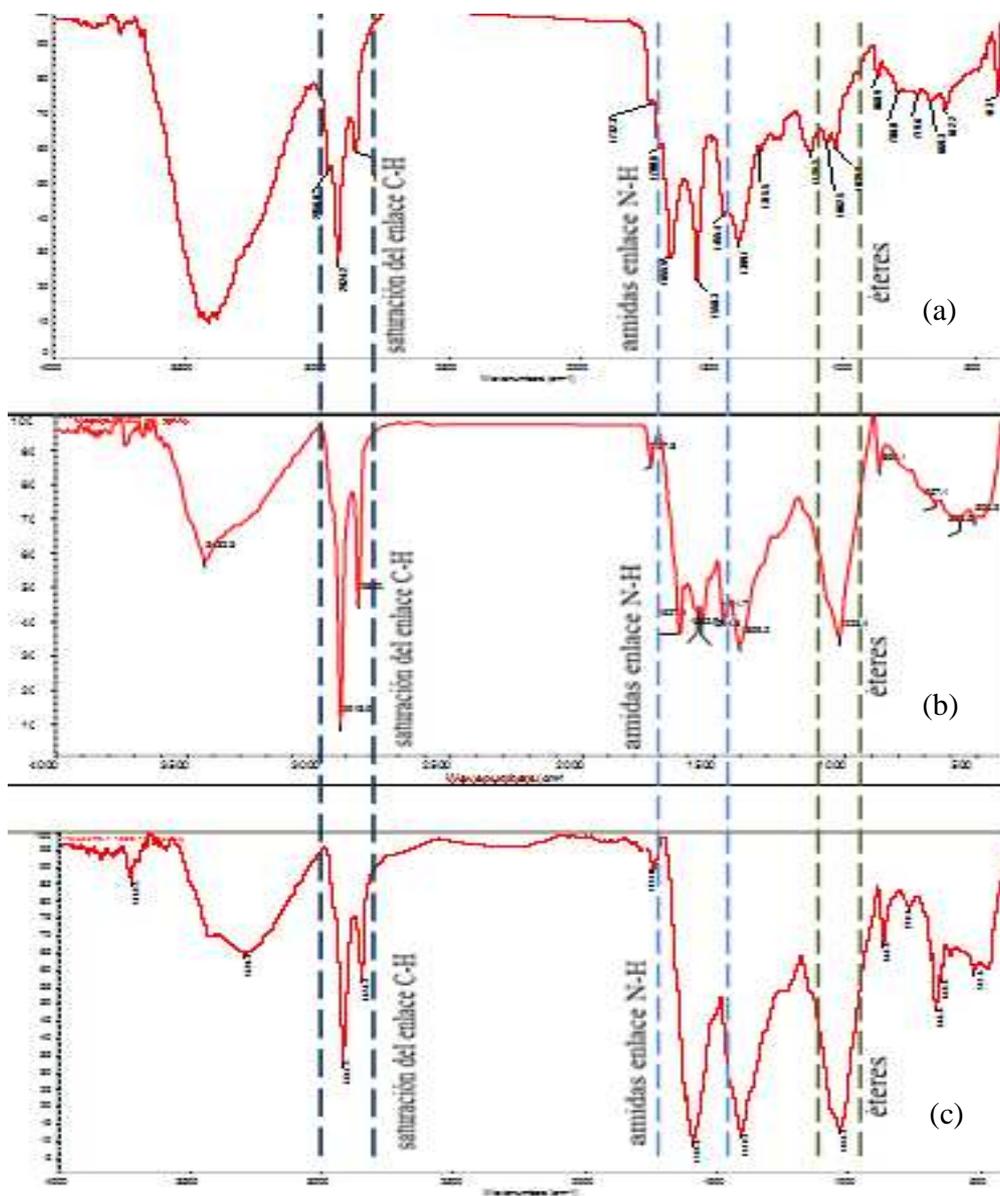


Figura N°17: Comparación de los espectros obtenidos en las experiencias de incremento de presión usando extracción supercrítica, trabajando a 1300 psi (a), 1600 psi (b) y 1900 psi (c)

La Figura N°17 muestra en orden descendente los espectros correspondientes a las presiones de 1300 psi, 1600 psi y 1900 psi respectivamente, así como las 3 bandas características observadas en los mismos. En primer lugar se puede distinguir en los 3 espectros la señal correspondiente a la saturación del enlace C-H, la diferencia fundamental de las señales emitidas en esta región se observa en la definición de las señales, que muestra un incremento secuencial con cada aumento de la presión. Seguidamente se puede observar que en el espectro correspondiente a 1600 psi dentro de la zona de la huella dactilar, se distingue con mayor claridad el grupo funcional de los éteres con tensión en el enlace C-O evidenciada en el pico de 1023.4cm^{-1} . Asimismo se observa que existe una mayor intensidad de los grupos característicos mostrados en el espectro correspondiente a la experiencia de 1300 psi, lo que induce a pensar que se genera una extracción más eficiente debido al incremento de la presión.

Los picos de mayor relevancia en el espectro correspondiente a 1900 psi son muy parecidos a los del espectro correspondiente a 1600 psi y los grupos funcionales se pueden caracterizar de manera similar. La principal diferencia entre ambos espectros se debe a que aquí se observan con mayor claridad los picos constituyentes del extracto. Vale la pena resaltar el pico de 1410.10 cm^{-1} que no se aprecia en la Figura N°12 e indica el sobretono de la tensión del enlace carbono-hidrógeno saturado. Este espectro indica, que al igual que en el aumento de la presión de 1300 psi a 1600 psi el incremento de la presión permite la adquisición de un espectro mucho más limpio y definido donde las bandas de los grupos funcionales del aceite esencial de Neem se aprecian con mayor claridad en el espectro infrarrojo.

El aumento de la calidad del extracto con respecto al incremento de la presión de compagina con la cantidad extraída del mismo como se puede observar a continuación en la Figura N° 18.

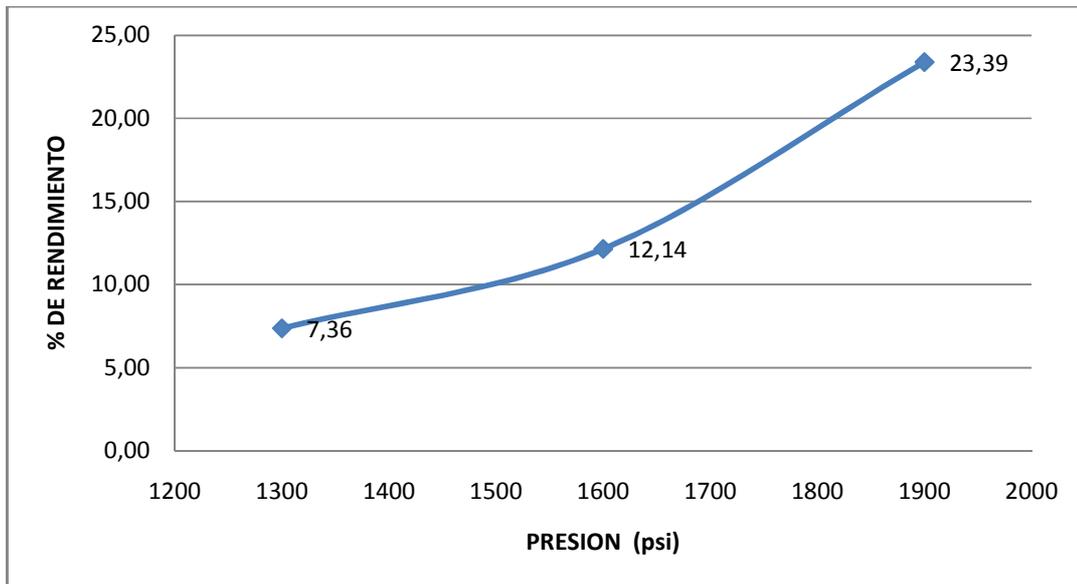


Figura N°18: Influencia de la presión sobre el rendimiento en las pruebas de extracción supercrítica usando CO₂ como solvente.

En esta figura se observa claramente el incremento del porcentaje de rendimiento con la presión, asimismo se tiene una variación significativa en cuanto al valor correspondiente a 1900 psi que significó un incremento del porcentaje de rendimiento equivalente a casi el doble del incremento alcanzado en 1600 psi, resultando ésta, presión óptima para estas experiencias. Por esta razón para las pruebas de variación de la temperatura se decidió fijar este valor.

Físicamente se puede explicar este fenómeno de aumento del rendimiento, debido a que al ejercer mayor presión sobre la matriz vegetal se obtiene una mayor velocidad de difusión sobre la misma, haciendo que el equilibrio de concentraciones solvente-aceite se alcance con mayor rapidez.

Vale la pena resaltar que existe la posibilidad de que existan pérdidas de aceite esencial de Neem volatilizado con el solvente, debido a que a pesar de que se trabajó con una velocidad de descarga lenta del equipo de extracción supercrítica es probable

que el extracto contenido en el CO₂ no pudiera condensar en su totalidad en el balón de descarga de extracción supercrítica (SS-01).

IV.3.4 Análisis de las muestras obtenidas en la extracción supercrítica correspondientes al incremento de la temperatura.

Hasta este momento del análisis, sólo se ha trabajado con experiencias donde se incrementó la presión. A continuación se discutirán los espectros correspondientes al incremento de la temperatura, empezando con la figura N°19 que muestra el espectro infrarrojo correspondiente a la prueba de Extracción Supercrítica trabajando a 1900 psi y a 30°C. Al igual que como se hizo con la experiencia de la influencia de presión se caracterizará la muestra de menor temperatura y posteriormente se presentará una figura comparativa de todos los espectros y la influencia del incremento de esta variable sobre las señales emitidas.

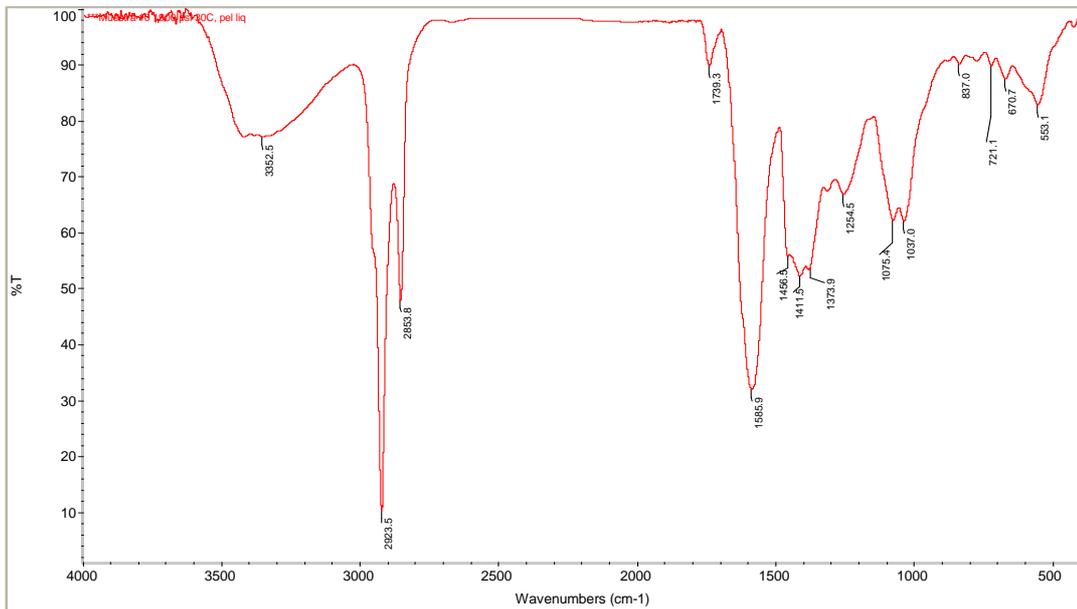


Figura N°19 Espectro infrarrojo de la prueba de Extracción Supercrítica trabajando a 1900 psi y a 30°C.

Al igual que en los espectros anteriores se observa aunque menos pronunciada la presencia del enlace O-H, además se perciben con mayor claridad que en todos los espectros anteriores los picos de 2918.6 cm^{-1} de 2849.9 cm^{-1} . Los siguientes picos constituyentes de este espectro, son de baja y mediana intensidad y denotan menor claridad en casi todas las bandas, aunque presentan gran similitud a los picos obtenidos a 1600 psi y temperatura ambiente, las bandas están mucho menos definidas que en espectros previos.

El pico de 1585.9 cm^{-1} indica la presencia del grupo funcional de las amidas, también se repite la presencia de éteres pero con menor intensidad. Finalmente se observan remarcaciones de la tensión del enlace carbono hidrógeno saturado.

Se puede observar que al controlar la temperatura del sistema se obtiene un ensanchamiento considerable de las bandas que sugiere una mayor definición de los compuestos de aceite esencial de Neem en las muestras extraídas.

Los grupos funcionales más relevantes se observan en la figura N° 20 donde se muestran los espectros de cada experiencia y se puede apreciar la similitud del número de onda y la diferencia de intensidad las bandas. Los espectros corresponden a las experiencias de 30°C , 45°C y 60°C todas trabajadas a 1900 psi.

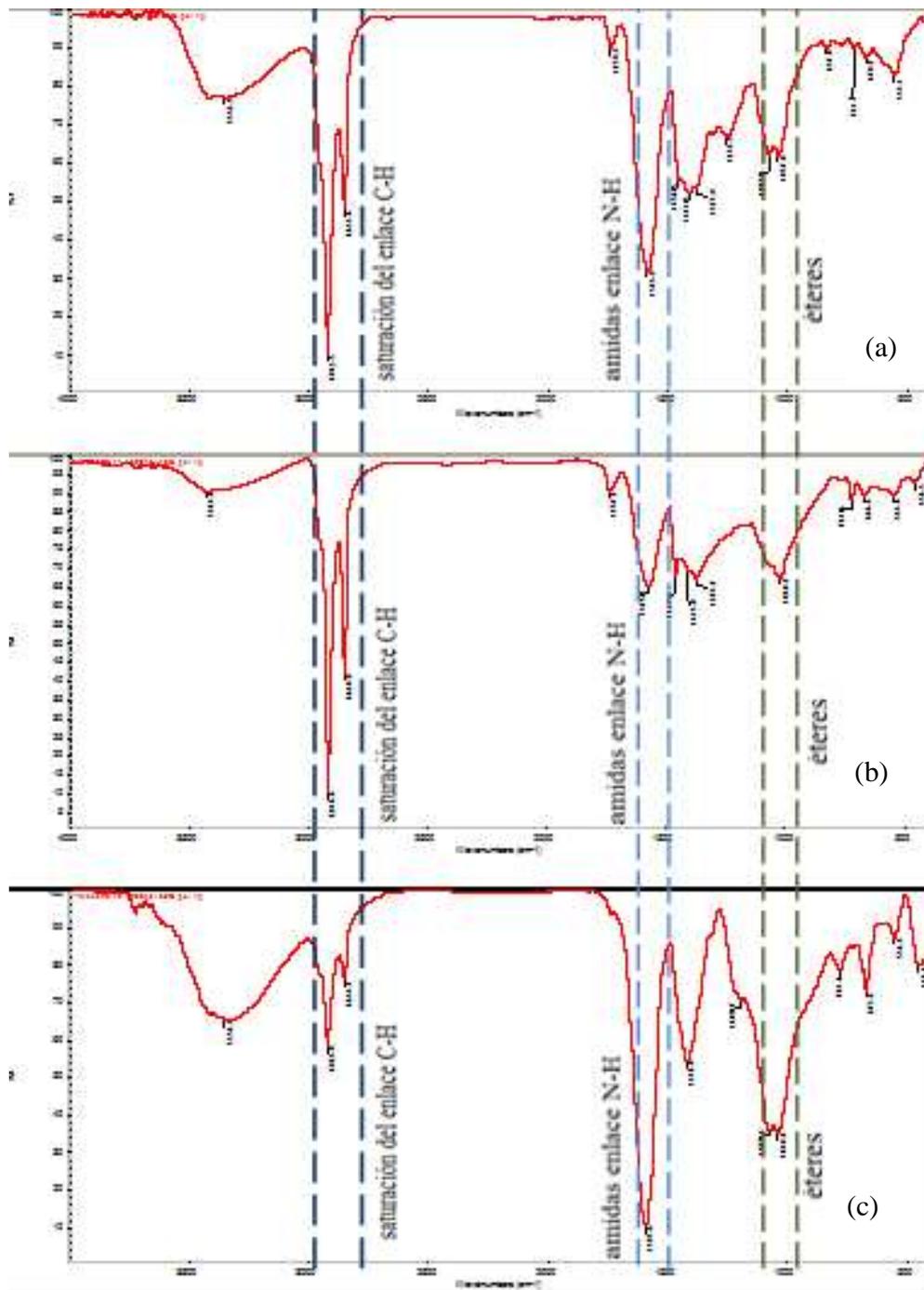


Figura N°20: Comparación de los espectros obtenidos en las experiencias de incremento de temperatura trabajando a una presión de 1900 psi, usando extracción supercrítica a 30°C (a), 45°C (b) y 60°C (c).

En esta figura se presentan en orden descendente los espectros correspondientes a las experiencias de incremento de temperatura de 30°C, 45°C y 60°C respectivamente. Para empezar a analizar esta figura se puede decir que al igual que en el espectro correspondiente a la experiencia a 30 °C, se tiene una gran definición de las bandas características de la tensión del enlace saturado carbono-hidrógeno, pero en contradicción a lo que se esperaba, el espectro correspondiente a la experiencia a 45°C muestra unos picos menos intensos en la zona de la región dactilar. Al igual que en todas los espectros anteriores existe una ausencia total de señales desde 2800 cm^{-1} hasta 1800 cm^{-1} , también existen picos medianos que indican la presencia de amidas y éteres.

Un factor considerable es el hecho de que en las pruebas de influencia de temperatura, se disminuye considerablemente la intensidad de las bandas que indican la presencia del agua en las muestras. Llama la atención la similitud de los picos en la zona de huella digital en el espectro correspondiente a 45°C, ya que los mismos como se puede apreciar se distribuyen de manera casi uniforme en esta región. Esto indica que a estas condiciones de operación se hace menos selectiva la gama de compuestos obtenidos del aceite esencial de Neem.

En el espectro correspondiente a la experiencia de 60°C se observa que la señal correspondiente a la sección del solvente disminuye su intensidad como se comentó anteriormente, y también la señal correspondiente al enlace saturado de carbono-hidrógeno tiene la menor intensidad de las muestras recolectadas durante las experiencias de influencia de la temperatura. A su vez se observan las señales más claras de la región de huella digital de todas las experiencias, delimitando muy claramente en 1593.8 cm^{-1} la presencia del grupo de las amidas con un sobretono débil en 1203.7 cm^{-1} que indica la posible presencia de una amida mono sustituida.

Luego se remarca la presencia del enlace carbono-hidrógeno y posteriormente se observa en 1075.6 cm^{-1} y 1040.2 cm^{-1} la presencia de éteres alifáticos. Para culminar

en la región del infrarrojo lejano se observan algunos sobretonos de los grupos funcionales anteriormente analizados.

Sobre los porcentajes de rendimiento alcanzados en estas experiencias los mismos aumentaron conforme se aumentó la temperatura. Esto se demuestra en la figura N° 21 que muestra la influencia de la temperatura en el proceso de extracción supercrítica trabajando a la presión óptima encontrada previamente.

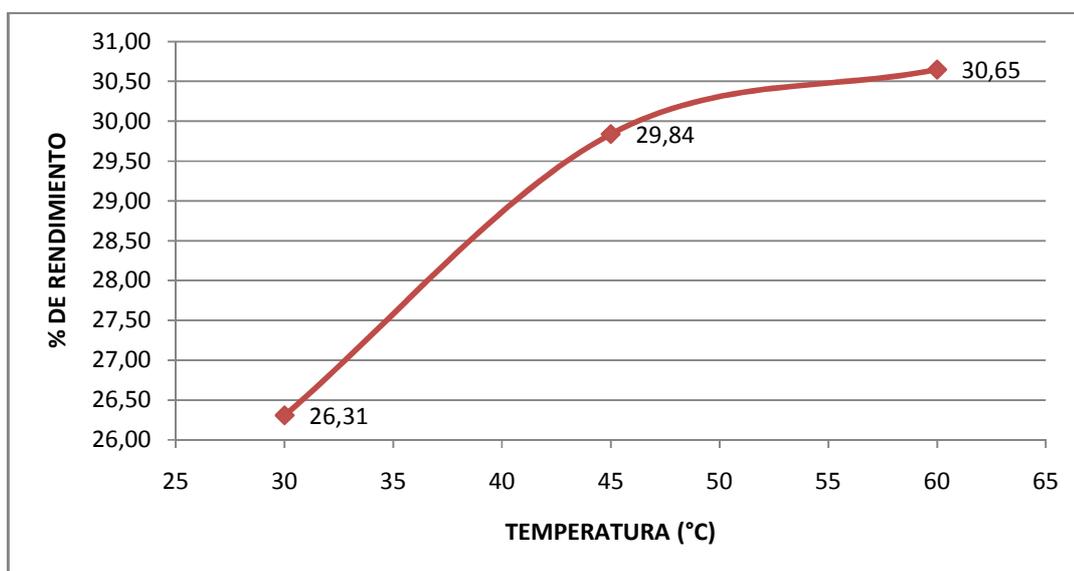


Figura N°21: Influencia del incremento de la temperatura en las pruebas de extracción supercrítica usando CO₂ como solvente, y trabajando a una presión fija de 1900 psi.

En este gráfico se observa una curva creciente en todo su dominio y un incremento notable del porcentaje de rendimiento en T= 45°C. Los incrementos del rendimiento de esta curva se explican ya que al aumentar la temperatura del solvente, se hace posible que se alcance un mayor grado de saturación de extracto en el mismo. Como se puede observar al trabajar a 60°C se obtuvo el máximo porcentaje de rendimiento y por esta razón esta es la temperatura óptima de trabajo para estas experiencias.

IV.3.5 Análisis de las muestras obtenidas en las experiencias de destilación convencional con agua.

A continuación se presentan los resultados de las pruebas de hidrodestilación cabe recordar que la variable de estudio para esta experiencia fue el volumen del solvente para la misma cantidad de hojas de Neem. En primer lugar se hará la caracterización cualitativa de las muestras y posteriormente se estudiará el análisis cuantitativo. Se introduce la Figura N° 22 donde se observan las bandas de los grupos funcionales constituyentes del aceite esencial de Neem obtenidos por destilación con agua usando un volumen de 200ml de este solvente.

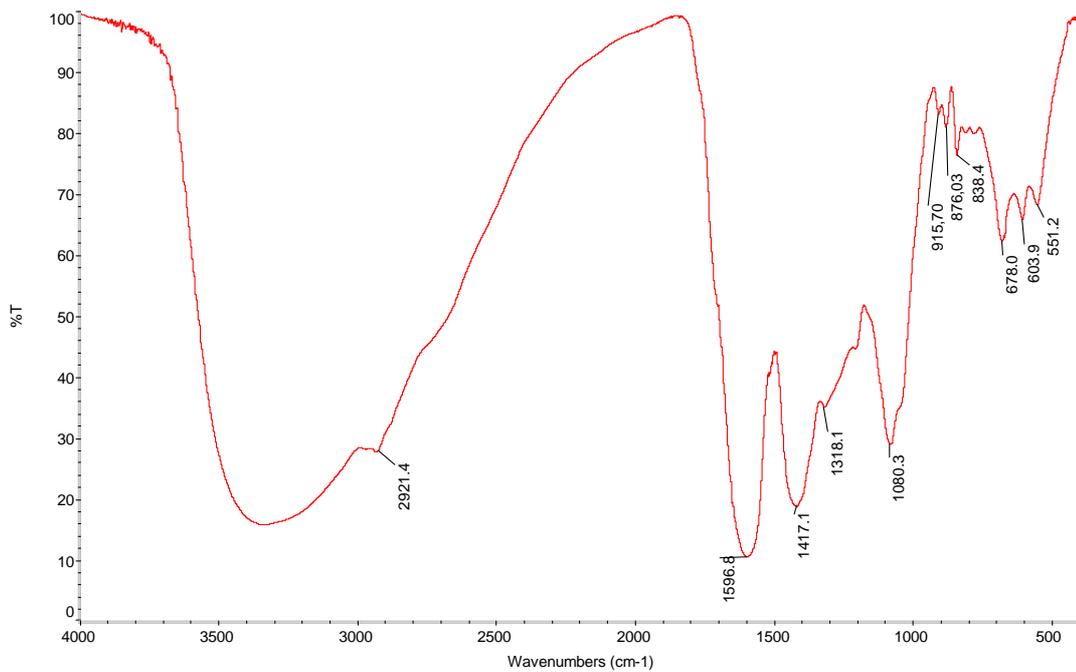


Figura N°22: Espectro infrarrojo de la prueba de Extracción Convencional con agua trabajando con un volumen de agua de 200ml.

En este espectro se puede observar que la ancha frecuencia entre 3500 cm⁻¹ y 2000cm⁻¹ hace evidente la presencia del agua utilizada en estas pruebas y hay una

muy pequeña inflexión en 2921.4cm^{-1} que hace posible la presencia del mismo enlace carbono hidrógeno saturado que ha estado presente en todos los espectros estudiados hasta ahora. Seguidamente también existe una banda que puede ser adjudicada a la torsión del enlace N-H constituyente de las amidas, también se observa la similitud existente con casi todos los grupos funcionales obtenidos por la extracción supercrítica y este tipo de extracción al parecer intensifica la señal de las amidas como se puede observar en la Figura 22 ya que este es el pico de mayor intensidad.

En la Figura N° 23 se puede apreciar la similitud de los espectros obtenidos por hidrodestilación usando un volumen de solvente de 200ml y 400ml respectivamente.

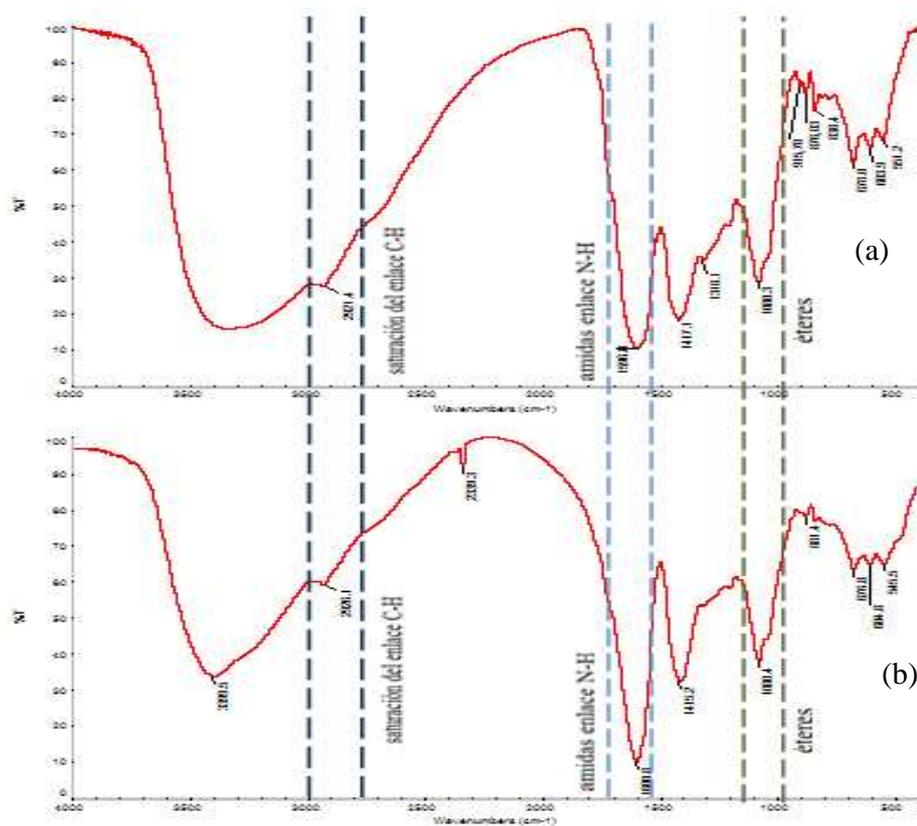


Figura N°23: Comparación de los espectros obtenidos en las experiencias de hidrodestilación, variando la cantidad de solvente utilizada para 200ml (a) y 400 ml (b) de agua.

Como se puede apreciar en esta figura comparativa, en el espectro correspondiente a la experiencia con 400 ml, se observa una menor intensidad en la sección de la curva correspondiente al solvente, aunque igualmente se respalda la presencia del enlace O-H del agua. Asimismo se observa la selectividad del método de extracción sobre las amidas, ya que al igual que en la experiencia con 200 ml esta señal es la más resaltante dentro del espectro. Se puede observar la clara diferencia de intensidad en el grupo funcional correspondiente a los éteres.

Al comparar las 2 experiencias de hidrodestilación se observa que la selectividad de las mismas no es un factor relevante ya que el variar el volumen no cambia significativamente los espectros en cuanto a su composición. En contraposición, las experiencias de extracción supercrítica evidenciaron que el modificar variable, cambia la amplitud de las señales y afecta las selectividades de las muestras.

En cuanto a los porcentajes de rendimiento alcanzados, se tiene que para la experiencia con 200 ml se obtuvo un 26,20% y para la de 400ml se obtuvo un 24,14%. Este fenómeno se puede explicar ya que al aumentar la cantidad de solvente, para la misma cantidad de hojas, conservando el mismo equipo de condensación y suministrando la misma cantidad de calor al sistema es muy probable que el flujo de vapor producido por la ebullición superara la capacidad de enfriamiento que le entregara el condensador (C-01), provocando así que se escaparan con mayor facilidad los vapores producidos por la ebullición en el matraz (M-01).

En base a que las señales emitidas en ambos espectros son prácticamente iguales y a que el porcentaje de rendimiento no cambia significativamente al incrementar el volumen, se intuye que el variar este parámetro en las pruebas de destilación convencional con agua no es un factor de significativa relevancia sobre la cantidad obtenida, ni sobre la calidad del aceite esencial de Neem extraído.

Al comparar las muestras obtenidas en cuanto a los rendimientos obtenidos, se evidencia que la mayor cantidad de aceite obtenido se obtiene en la experiencia de extracción supercrítica la trabajar a 1900 psi y 60 °C. Además en esta experiencia se

obtienen los picos característicos de mejor definición arrojados por los espectros. Al comparar los valores de porcentaje de rendimiento obtenidos y observando la inversión necesaria para llevar a cabo ambas experiencias resulta mucho más viable tanto económica como funcionalmente realizar la extracción convencional con agua, ya que, si bien existe una diferencia significativa entre los rendimientos obtenidos, el análisis cualitativo indica la presencia de los grupos funcionales obtenidos en la extracción supercrítica.

El costo del solvente es un parámetro significativo, que favorece la aplicabilidad de la extracción convencional con agua, ya que este solvente es mucho más económico que los demás solventes utilizados en el resto de las experiencias.

La desventaja principal de este método radica en el largo tiempo de extracción necesario para obtener el aceite esencial de Neem y en el suministro constante de energía en forma de calor necesaria para la ebullición del agua. En contraposición se puede decir que las ventajas de usar extracción supercrítica son el poco tiempo de extracción necesario, la cantidad de aceite extraído y la alta concentración de los grupos funcionales obtenidos en las muestras.

IV.5 ESTUDIO DE LA DENSIDAD E INDICE DE REFRACCIÓN DE LAS MUESTRAS OBTENIDAS.

A continuación se muestran en la Tabla N°7 los resultados obtenidos en cada muestra en cuanto al índice de refracción y la densidad calculada. La densidad se calcula por la diferencia de masa de un contenedor llamado picnómetro y la masa de la muestra obtenida, esto se divide entre el volumen del picnómetro y se obtiene el valor de la densidad. Resulta evidente que el volumen y la masa del picnómetro deben ser conocidos. La forma analítica en que se calcula la densidad se especifica en el Anexo D.

Tabla N° 7. Índice de refracción y densidad de las muestras recogidas en cada experiencia.

MUESTRA N°	TIPO DE EXTRACCION	INDICE DE REFRACCION	DENSIDAD DE LA MUESTRA ((g/ml)
1	ESC	1,3346	0,9999
2	Hidrodestilación (200ml)	1,3351	1,0000
3	Soxhlet	1,3581	0,8190
4	ESC	1,3611	0,8231
5	ESC	1,3373	1,0000
6	Hidrodestilación (400ml)	1,3353	1,0049
7	ESC	1,3311	1,0064
8	ESC	1,3353	1,0022
9	ESC	1,3314	1,0067
10	ESC	1,3225	0,9946
11	ESC	1,3331	1,0092
12	ESC	1,3338	1,0237

Estos valores muestran un sesgo significativo de los extractos a la propiedad física del solvente puro, tanto para la densidad como para el índice de refracción. Esto es debido a que en casi todos los casos de extracción supercrítica se utilizaron como medio de transporte o arrastre estos solventes.

En cuanto a la extracción convencional las muestras analizadas son la mezcla restante del equilibrio líquido-vapor luego de las 24 horas de contacto. Gráficamente se puede observar en la Figura N° 24 comparando con la densidad del agua y del etanol un sesgo significativo a la propiedad del solvente puro.

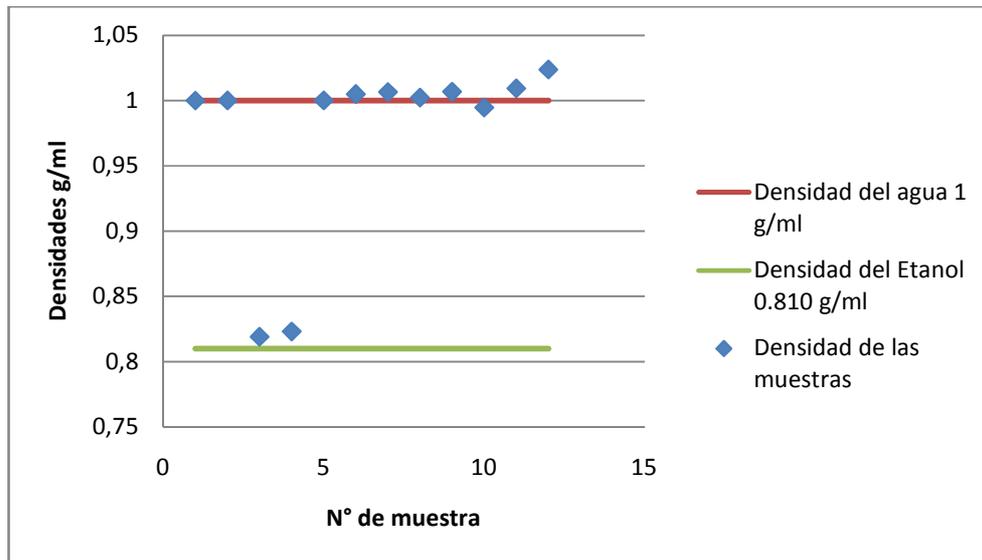


Figura N°24: Variación de las densidades calculadas de las muestras con respecto a las densidades de los solventes puros.

En cuanto al índice de refracción, también se puede observar una gran similitud entre la propiedad de los solventes y la de las muestras. Esta similitud se puede apreciar en la figura N°25.

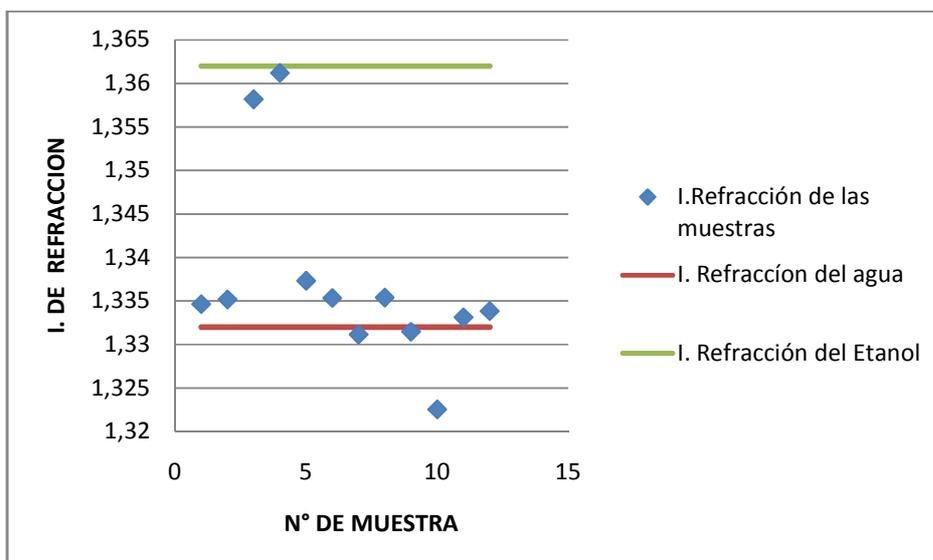


Figura N°25: Variación del índice de refracción de las muestras con respecto al de los solventes puros.

En este gráfico (Figura N° 25) se muestra la tendencia de las muestras a emular el índice de refracción de los solventes, vale la pena recordar que las muestras 4 y 5 fueron en donde se utilizó el etanol y por esto el cambio brusco de la curva, asimismo existe un punto atípico en cuanto a la tendencia de las muestras en las cuales se usó agua como medio de arrastre que probablemente se deba a un error de apreciación de lectura en el refractómetro.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

Una vez presentados y posteriormente analizados los resultados obtenidos en cada experiencia en cuanto a su composición y cantidad recuperada surgen las siguientes conclusiones de este Trabajo Especial de Grado.

- ✓ El uso de un cosolvente constituye una limitante operativa importante para el equipo de extracción supercrítica debido a las condiciones actuales del mismo.
- ✓ El uso de Etanol hace más selectivo el extracto de aceite esencial de Neem hacia los aldehídos que hacia los éteres.
- ✓ El incremento del volumen en las pruebas de hidrodestilación no muestra un cambio significativo en cuanto al porcentaje de recuperación, tampoco lo hace en cuanto a la composición de los grupos funcionales mostrados en los espectros de infrarrojo.
- ✓ El porcentaje de recuperación aumentó significativamente con cada aumento de presión. Obteniendo la mayor cantidad de extracto en P=1900psi.
- ✓ No existe una diferencia cualitativamente clara en cuanto a los espectros de infrarrojo arrojados por las muestras de extracción supercrítica usando etanol como solvente y la experiencia con etanol usando el método Soxhlet.
- ✓ El aumento de la temperatura influye favorablemente sobre la cantidad recuperada en las pruebas de extracción supercrítica, y también permite que se observen con mayor claridad los grupos funcionales presentes en el extracto, debido al aumento de la transmitancia en los espectros de Infrarrojo.
- ✓ La temperatura óptima de trabajo encontrada fue 60°C.
- ✓ El estudio de los espectros de infrarrojo no permite tener una idea clara de la composición de los extractos debido a que existe en cada uno de ellos, una gran cantidad de solvente o medios de arrastre presente en las todas las muestras.

- ✓ La diferencia fundamental entre llevar a cabo la experiencia de extracción supercrítica y la de hidrodestilación, radica principalmente en el costo del solvente y en el tiempo de extracción. En base a estos parámetros la hidrodestilación resulta mucho más económica y funcional.
- ✓ La densidad y el índice de refracción en todas las experiencias de extracción poseen valores similares a los de los solventes utilizados en cada experiencia, es por esto que no son variables relevantes para analizar la composición del aceite.
- ✓ La mayoría de los espectros analizados indican la presencia de amidas, éteres y aldehídos así como la presencia de cadenas alquílicas.
- ✓ La presencia de los grupos funcionales encontrados en los espectros de infrarrojo indican la presencia de unidades isoprénicas y otros grupos funcionales constituyentes de los compuestos más importantes de aceite esencial de Neem.

CAPÍTULO VI

RECOMENDACIONES.

En este Trabajo Especial de Grado se han aplicado distintas técnicas de extracción y de análisis, de la experiencia obtenida en el transcurso de esta investigación se derivan las siguientes recomendaciones aplicables a estudios posteriores referentes al tema.

- ✓ La caracterización de los extractos debe verificarse con algún otro método aplicable como la espectrometría de masas o la cromatografía.
- ✓ Aplicar un control de flujo para la descarga del equipo que garantice una velocidad de descarga constante y así se optimice la condensación del extracto luego de la salida del equipo.
- ✓ Aplicar un control de presión en el autoclave o cambiar la válvula de venteo ya que la misma se encuentra deteriorada.
- ✓ Colocar una manta de calentamiento o algún otro sistema de intercambio de calor alrededor del capilar de descarga para que por el fenómeno de expansión del gas saliente esta tubería delgada no se obstruya causando problemas operacionales.
- ✓ Colocar un filtro de acero inoxidable antes de la válvula de descarga del equipo para así evitar posibles obstrucciones de la tubería con partículas de matriz vegetal en el equipo, a la salida de extracto.
- ✓ Instalar válvulas de alivio o venteo a lo largo del equipo de extracción supercrítica para así garantizar la seguridad a la hora de un aumento brusco de presión.
- ✓ Estudiar el aumento del porcentaje de recuperación si se aplica una etapa posterior de extracción sobre la matriz de extracción supercrítica.
- ✓ Estudiar la posibilidad de instalar un sistema de recuperación de solvente para minimizar costos operativos.

- ✓ Instalar un sistema más efectivo de separación de solvente para la experiencia de extracción supercrítica.
- ✓ Realizar estudios con otros solventes supercríticos para estudiar la influencia del tipo de solvente sobre las hojas de Neem y la posterior caracterización del aceite extraído.
- ✓ Adquirir un compresor de CO para poder hacer estudios de. Extracción supercrítica a mayores presiones de operación
- ✓ Adquirir un equipo de contacto que resista mayores presiones a fin de poder realizar barridos presión en un rango mayor.
- ✓ Variar el tiempo de residencia de la matriz para estudiar el comportamiento de porcentaje de rendimiento y la calidad del extracto.
- ✓ Adquirir condensadores de mayor longitud para las experiencias de hidrodestilación para así disminuir la posibilidad de que los compuestos más volátiles se eliminen del sistema.
- ✓ Adquirir balones y mantas de calentamiento de mayor capacidad para poder estudiar en un mayor rango la influencia de variar el volumen de solvente sobre la matriz vegetal
- ✓ Realizar estudios de optimización de procesos de separación de aceites. esenciales y solventes.
- ✓ Aplicar nuevas técnicas de extracción a las hojas de Neem como la extracción asistida por microondas y estudiar el comportamiento de la extracción con otro tipo de solventes.
- ✓ Buscar empresas privadas que estén interesadas en el Neem para que apoyen económicamente este tipo de investigaciones.
- ✓ Estudiar la extracción supercrítica sobre semillas de Neem, y los parámetros de optimización que involucran este proceso.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- ARMAS G. César E, CORREDOR S. Janny A. (2007). "Comparación de procesos de extracción del aceite esencial de vetiver". Trabajo especial de grado. Universidad Central de Venezuela, Caracas.
- AVILA NUÍEZ, Ramona. (2000). "Aproximación a la síntesis de la margolona, un diterpeno aislado de *Azadirachta Indica* A. Juss. Síntesis de la 7-Dioxo-Margolona. Trabajo especial de grado". Universidad Central de Venezuela, Caracas.
- BARROETA, Ginnette "El Árbol de Neem". (2005). Pasantía de investigación. Universidad Central de Venezuela, Caracas.
- BERNARDINI, E. (1981). "Tecnología de Aceites y Grasas". España. Editorial Alambra.
- CARDENAZ M., Camilo E. (1997). "Estudio Preliminar de la extracción con CO₂ supercrítico de terpenos del toronjil" (*Melissa Officinalis*). Trabajo de Grado, Universidad Central de Venezuela, Caracas.
- CREEL, Howard.(1993) "Prospects for the Analysis of High Molar Mass Polymers Using MALDI Mass Spectrometry".
- DE LOS RÍOS, A. P; Hernández-Fernández, F. J. (2008). "Los fluidos supercríticos como disolventes alternativos en la industria química".
- ETCHEVERRY, Natalia M. (2003). "Medicina Tradicional de México y sus Plantas Medicinales". Disponible en: <http://www.tlahui.com/medic/medic18/neem.htm>.
- FLEMING, Ian, WILLIAMS, Dudley H.(1989) "Spectroscopic methods in organic chemistry". Mc Graw Hill.
- GARMENDIA, Pedro B. (2004). "Estudios en domesticación y cultivo de especies medicinales y aromáticas nativas". Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Uruguay.
- GIL PAVAS, Edison; SÁEZ VEGA, Alex. (2005). "Evaluación a escala de planta piloto del proceso industrial para la obtención de aceite esencial de cardamomo, bajo la filosofía cero emisiones". Universidad Eafit, Medellín.

- GONZÁLEZ B., SARA M. (2007). "Extracción de cafeína de las semillas de café utilizando como solvente dióxido de carbono en condiciones supercríticas". Trabajo especial de grado. Universidad Central de Venezuela, Caracas.
- GUERRA, María. (2001). "Formulación de insecticidas a base de Azadirachtin obtenido del árbol de Neem". Trabajo especial de grado. Universidad Central de Venezuela, Caracas.
- LARSON, Robert. (1984). "stable anti-pest neem seed extract."
- LEUPIN, Ruth Elizabeth. (2003). "Vetiveria zizanioides: an approach to obtain essential oil variants via tissue culture". Swiss Federal Institute of Technology Zürich, Zürich.
- MÁRQUEZ, Lerayne. (2003). "Extracción del aceite esencial de mandarina (*Citrus reticulata*) utilizando dióxido de carbono en condición supercrítica como solvente". Trabajo especial de grado. Universidad Central de Venezuela, Caracas.
- MATUTE, R., Ignacio L. (1987). "Estudio Preliminar de la extracción de aceite esencial de naranja con solvente en condiciones críticas". Trabajo de Grado no publicado, Universidad Central de Venezuela, Caracas.
- MAZZANI, Bruno. (1973). "Cultivo y Mejoramiento de Plantas Oleaginosas". Trabajo Especial de Grado, Universidad Central de Venezuela, Caracas.
- MONTAÑEZ, José (2005). "Desarrollo de un bioinsecticida a partir de la azadiractina presente en el aceite de Neem" (*Azadirachta Indica*). Trabajo Especial de Grado de, Universidad de Carabobo, Valencia Venezuela.
- MUKHOPADHYAY M. (2000). "Natural Extracts using Supercritical Carbon Dioxide" CRC Press.
- NAGASAMPAGI, Bhimsen A; SUDAPA R Rojatkat; MANDAKINI M. Kullkarni; VIMAL S. Joshi; VIDYA S. Bhat; MUKUND G.Sane; NAGARAJ R. AYYANGAR, all of Maharashtra, India. (1995). "Triterpene derivatives of azadirachtin having insect antifeedant and growth inhibitory activity and a process for extracting such compounds from the neem plant".
- NAKAMOTO, K. (1997). "Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds".

OFFICE OF INTERNATIONAL AFFAIRS (OIA).(1992). "Neem: A Tree for Solving Global Problems".Disponible en: <http://www.nap.edu/openbook.php?>.

ORDOÑEZ, J. (1998). "Tecnología de los Alimentos", volumen1. Síntesis, S.A.

PERRY, John A.(1981). "Introduction to Analytical Gas Chromatography: History, Principles and Practice". Chromatographic.

RAMOS S, Raúl.(2002). "Aceite de neem un insecticida ecológico para la agricultura". Disponible en:<http://www.zoetecnocampo.com>

SOLEDAD O., ZURIDAY Y. (2007). "Extracción de manteca a partir de semillas de cacao utilizando dióxido de carbono en condiciones supercríticas como solvente". Trabajo especial de grado. Universidad Central de Venezuela, Caracas.

STASHENKO Elena E. (1998). "Aceites esenciales: Técnicas de extracción y análisis". Universidad Industrial de Santander, Santander.

TAPIA Opazo, Tania Gloria. (2005). "Estudio de la composición química de volátiles de raíces de trébol rosado" (*Trifolium pratense*) de diferentes estados de desarrollo y su eventual efecto atractor hacia el insecto *Hylastinus obscurus*. Universidad de la frontera. Temuco, Chile.

VELASCO, Reinaldo J; VILLADA, Héctor S; CARRERA Jorge E. "Aplicaciones de los Fluidos Supercríticos en la Agroindustria Universidad del Cauca". Departamento de Agroindustria, Facultad de Ciencias Agropecuarias.

WADE, L. G (1993) "Química Orgánica". Prentice hall Latinoamericana.

ANEXOS

En este segmento de la investigación se presenta información de considerable relevancia para la realización de este Trabajo Especial de Grado, que por su extensión y carácter ha sido omitida para dar un entendimiento mayor a las ideas y objetivos principales de la investigación. Los anexos están constituidos por los datos experimentales recogidos, seguidamente de los cálculos típicos del porcentaje de rendimiento además de las densidades de las muestras, las imágenes más relevantes vinculadas a esta investigación y finalmente las tablas utilizadas para la caracterización por espectroscopía de infrarrojos.

ANEXO A: Datos experimentales recolectados durante la investigación, vinculados al cálculo del porcentaje de rendimiento.

A continuación se presentan en Tabla N°8 los datos recolectados en cada experiencia para el cálculo de los respectivos porcentajes de rendimiento.

Tabla N°8: Datos recolectados para el cálculo de los porcentajes de rendimiento.

MUESTRA N°	TIPO DE EXTRACCION	MASA INICIAL (g)	MASA FINAL (g)	% DE RENDIMIENTO
1	ESC	50,01	46,33	7,36
2	Hidrodestilación (200ml)	25	18,45	26,20
3	Soxlet	24,99	18,91	24,33
4	ESC	50,14	46,18	7,90
5	ESC	50,07	45,91	8,31
6	Hidrodestilación (400ml)	25,06	19,01	24,14
7	ESC	50,24	38,49	23,39
8	ESC	50,16	37,91	24,42

Tabla N°8 (Continuación).

MUESTRA N°	TIPO DE EXTRACCION	MASA INICIAL (g)	MASA FINAL (g)	% DE RENDIMIENTO
9	ESC	50,49	44,36	12,14
10	ESC	50,21	37	26,31
11	ESC	50,24	35,25	29,84
12	ESC	50,48	35,01	30,65

ANEXO B: Datos experimentales recolectados durante la investigación, vinculados al cálculo de la densidad.

Seguidamente, se presenta la Tabla N°9 que muestra las variables involucradas en el cálculo de la densidad de cada una de las muestras.

Tabla N°9: Datos recolectados para el cálculo de las densidades de las muestras.

MUESTRA N°	TIPO DE EXTRACCION	M.P LLENO (g)	M. P VACIO (g)
1	ESC	43,3891	18,45
2	Hidrodestilación (200ml)	43,3903	18,45
3	Soxlet	38,878	18,45
4	ESC	38,9791	18,45
5	ESC	43,392	18,45
6	Hidrodestilación (400ml)	43,5129	18,45
7	ESC	43,552	18,45

Tabla N°9 Continuación

MUESTRA N°	TIPO DE EXTRACCION	M.P LLENO (g)	M. P VACIO (g)
8	ESC	43,4462	18,45
9	ESC	43,5591	18,45
10	ESC	43,2556	18,45
11	ESC	43,6214	18,45
12	ESC	43,9815	18,45

ANEXO C: Cálculo del porcentaje de rendimiento de las muestras obtenidas.

Para estimar analíticamente el valor del porcentaje del rendimiento en cada una de las muestras se hace con la siguiente relación:

$$\%R = \left(\frac{M_o - M_f}{M_o} \right) * 100 \quad (\text{ec. 1})$$

Donde:

M_o : Masa inicial de hojas frescas de Neem (g)

M_f : Masa final de hojas de Neem después de cada proceso de extracción (g)

$\%R$: Porcentaje de rendimiento

Para mostrar cómo se calcula el porcentaje de Rendimiento se presenta a continuación el cálculo tipo de la muestra N°1, referido a la prueba de extracción supercrítica usando CO₂ como solvente y trabajando a una presión de 1300 psi.

Donde:

$$M_o = 50,01g$$

$$M_f = 46,33g$$

Sustituyendo en la ecuación 1.

$$\%R = \left(\frac{50,01g - 46,33g}{50,01g} \right) * 100 = 7,36\%$$

Para observar todos los valores numéricos calculados ver la Tabla N°8

ANEXO D: Cálculo de la densidad de las muestras obtenidas.

Para estimar analíticamente el valor de la densidad en cada una de las muestras se hace con la siguiente relación:

$$\rho = \frac{M_{\rho f} - M_{\rho o}}{v_{\rho}} \quad (\text{ec. 2})$$

Donde:

$M_{\rho f}$: Masa del picnómetro lleno (g).

$M_{\rho o}$: Masa del picnómetro vacío (g).

v_{ρ} : Volumen del picnómetro (ml).

ρ : densidad de la muestra. $\left(\frac{g}{ml}\right)$

Para mostrar el cálculo de la densidad de las muestras se toma como ejemplo el cálculo de la densidad de la muestra N°6 correspondiente a la prueba de hidrodestilación usando un volumen de agua de 400ml.

Donde:

$$M_{\rho f} = 43,5129g.$$

$$M_{\rho o} = 18,4500g.$$

$$v_{\rho} = 24,94ml.$$

Sustituyendo en la ecuación 2.

$$\rho = \frac{43,5129g - 18,4500g}{24,94ml} = 1.0049 \frac{g}{ml}$$

Para observar todos los valores numéricos calculados ver la Tabla N°7.

ANEXO E: Imágenes de los equipos utilizados en la investigación.-



Figura N°26: Equipo de extracción Supercrítica.



Figura N°27: Bombona de CO₂



Figura N°28: Montaje de prueba de hidrodestilación



Figura N°29: Montaje tipo soxhlet



Figura N° 30: Autoclave de presurización RP-01 con CO₂



Figura N° 31: Diferencia entre las hojas después del proceso de extracción con el método soxhlet (Izquierda) y con el método de hidrodestilación (Derecha)



Figura N° 32: Montaje de las experiencias que involucran el incremento de la temperatura.

Anexo F: Tablas de interpretación de Espectros de Infrarrojo (Wade, 1993)