

**CARACTERIZACION DE LOS ACEITES ESENCIALES DEL “*Pinus oocarpa*”
POR CROMATOGRAFIA DE GASES.**

FRANKLY JAVIER URBANO CERON

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUIMICA
POPAYÁN
2005**

**CARACTERIZACION DE LOS ACEITES ESENCIALES DEL “*Pinus Oocarpa*”
POR CROMATOGRAFIA DE GASES.**

FRANKLY JAVIER URBANO CERON

Trabajo de investigación para optar al título de Químico.

Director:

Mg. JOSE ANTONIO GALLO C.

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUIMICA
POPAYÁN
2005**

TABLA DE CONTENIDO.

	Pág.
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
1.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
2.0 OBJETIVOS.	4
2.1 OBJETIVO GENERAL.	4
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.	4
3.0 JUSTIFICACION	5
4.0 ASPECTOS TEÓRICOS Y ANTECEDENTES	6
4.1 Definición y localización de los Aceites Esenciales	8
4.2 Funciones de los aceites esenciales	9
4.3 Propiedades físicas de los aceites esenciales	9
4.4 Composición química de los aceites esenciales	9
4.5 Factores de variabilidad de los aceites esenciales	11
4.6 Biosíntesis	12
4.7 Métodos de extracción	13
4.8 Conceptos analíticos	15
5 METODOLOGÍA.	21
5.1 Materiales y equipos.	21
5.2 Reactivos	21
5.3 Procedimiento para la obtención del aceite esencial de <i>Pinus oocarpa</i>	22
5.4 Descripción de instrumentos.	25
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	27
6.1 Rendimiento del aceite esencial destilado	27
6.2 Constantes físicas	30
6.3 Solubilidad del aceite esencial <i>Pinus oocarpa</i>	31
6.4 Análisis espectroscópico y cromatografico	32

7	CONCLUSIONES.	48
8	RECOMENDACIONES	49
9	BIBLIOGRAFIA	50
	ANEXOS	53

LISTA DE TABLAS.

	Página
Tabla 1. Resultado de la extracción de acuerdo al tiempo.	27
Tabla 2. Resultado de la extracción de acuerdo al tamaño de partícula.	28
Tabla 3. Constantes físicas del aceite esencial de <i>Pinus oocarpa</i> .	30
Tabla 4. Solubilidad del aceite esencial de <i>Pinus oocarpa</i> .	31
Tabla 5. Condiciones optimas de trabajo en el Cromatógrafo de Gases.	34
Tabla 6. Limite de detección para α -pineno.	38
Tabla 7. Limite de Cuantificación para el α -pineno.	38
Tabla 8. Datos de las relación de áreas y desviaciones estándar del α -pineno y geraniol para el rango de concentraciones de 1-10 ppm	39
Tabla 9. Datos de las relación de áreas y desviaciones estándar del α -pineno para el rango de concentraciones de 10-100 ppm.	39
Tabla 10. Datos para la obtención del factor de respuesta curva 1 a 10 ppm.	40
Tabla 11. Datos de la desviación estándar para el factor de respuesta (F_R) curva 1 a 10 ppm.	40
Tabla 12. Datos para la obtención del factor de respuesta curva 10 a 100 ppm.	41
Tabla 13. Datos de la desviación estándar para el factor de respuesta (F_R) curva 1 a 10 ppm.	41
Tabla 14. Datos para realizar el t de student.	42
Tabla 15. Concentración de α -pineno en la muestra de acuerdo con los días de secado.	43

Tabla 16. Condiciones experimentales para el análisis por CG/MS.	44
Tabla 17. Composición del aceite esencial de <i>Pinus oocarpa</i> .	46

LISTA DE FIGURAS.

	Página
Figura 1. Fotografía, bosque <i>Pinus oocarpa</i> finca “San Benito” municipio de Cajibío. (C).	7
Figura 2. Algunas estructuras monoterpenicas.	10
Figura 3. Algunas estructuras de sesquiterpenos	11
Figura 4. Reacciones de condensación para la formación de Geranilpírofosfato y farnesilpírofosfato.	14
Figura 5. Diagrama esquemático del cromatógrafo de gases.	16
Figura 6. Sistema neumático de inyección.	17
Figura 7. Detector de ionización de llama.	19
Figura 8. Follaje de <i>Pinus oocarpa</i> .	23
Figura 9. Esquema del equipo de destilación por arrastre con vapor de agua proyectado para la extracción de aceites esenciales a partir del follaje de <i>Pinus oocarpa</i> .	24
Figura 10. tendencia del rendimiento del aceite esencial según el tiempo de secado.	29
Figura 11. Curva de Van Deemter con α - pineno para determinar el flujo óptimo (columna HP-INOWax 25m x 0.25mm x 0.25 μ m film).	34
Figura 12. Rampa de temperaturas para la cuantificación de aceites esenciales.	35
Figura 13. Cromatograma de la mezcla de los patrones α -pineno y geraniol como estándar interno.	35
Figura 14. Cromatograma del estándar interno en la muestra de	36

aceite esencial.

Figura 15.	Curva de calibración de α -pineno de 1-10 ppm.	37
Figura 16.	Curva de calibración de α -pineno de 10-100 ppm.	37
Figura 17.	Variación de la concentración de α -pineno con el paso de los días.	44
Figura 18.	Cromatograma del aceite esencial de <i>Pinus oocarpa</i> con detector selectivo de masas.	45

LISTA DE ANEXOS.

	Página
ANEXO A.	DESARROLLO DEL METODO. 53
ANEXO B.	ESPECTRO DE UV-VIS DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Pinus oocarpa</i> . 56
ANEXO C.	ESPECTRO DE IR DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Pinus oocarpa</i> . 57
ANEXO D.	a) ESPECTRO DE MASAS DE α -PINENO (SEÑAL A 3.26 min.) y a) ESPECTRO QUE PROVEE EL SOFTWARE DEL EQUIPO PARA α -PINENO. 58
ANEXO E.	a) ESPECTRO DE MASAS DE LA SEÑAL A 12.79 min. y b) ESPECTRO QUE PROVEE EL SOFTWARE DEL EQUIPO PARA CARIOFILENO. 59
ANEXO F..	a) ESPECTRO DE MASAS DE LA SEÑAL A 13.692 min. y b) ESPECTRO QUE PROVEE EL SOFTWARE DEL EQUIPO PARA 1,1,4,8-tetrametil-4,7,10-Cicloundecatrieno 60
ANEXO G.	a) ESPECTRO DE MASAS DE LA SEÑAL A 13.912 min. y b) ESPECTRO QUE PROVEE EL SOFTWARE DEL EQUIPO PARA 7-metil-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahidro-Naftaleno. 61
ANEXO H.	a) ESPECTRO DE MASAS DE LA SEÑAL A 14.171 min. y b) ESPECTRO QUE PROVEE EL SOFTWARE DEL EQUIPO PARA 1H-ciclopenta-1,3-ciclopropa-1,2-benceno. 62
ANEXO I.	a) ESPECTRO DE MASAS DE LA SEÑAL A 14.725 min. y b) ESPECTRO QUE PROVEE EL SOFTWARE DEL EQUIPO PARA 1,2,3,5,6,8a-hexahidro-4,7-dimetil-naftaleno. 63
ANEXO J.	a) ESPECTRO DE MASAS DE LA SEÑAL A 17.171 min. y b) ESPECTRO QUE PROVEE EL SOFTWARE DEL EQUIPO PARA Oxido de cariofileno. 64

LISTA DE ABREVIATURAS.

A E	Aceite Esencial
IPP	Isopentil Pirofosfato
DMAPP	gama, gama-dimetilalilpirofosfato
GPP	Geranil Pirofosfato
FPP	Farnesil Pirofosfato
CG	Cromatografía de Gases
FID	Detector de Ionización de Llama
CG/MS	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta resolución
AP	Alta Pureza
DI	Diámetro Interno
μL	Microlitros
F _R	Factor de respuesta
MSD	Detector Selectivo de Masas
psi	Libras por pulgada cuadrada
iR	Índice de refracción
IR	Infrarrojo
mg	miligramos
kg	kilogramos
g	Gramos
°C	Grado centígrado
ppm	Partes por millón
LOD	Límite de Detección
LOQ	Límite de Cuantificación

RESUMEN

En el departamento del Cauca existen más de 14000 hectáreas de bosques de pino, cultivados con fines madereros. En época de la tala, esta deja volúmenes de residuos muy grandes entre los que se encuentran el follaje, la corteza y árboles de no muy buena calidad. La disposición de estos residuos, se ha convertido en un problema ambiental en las áreas de cultivo por que los residuos son propensos a generar incendios forestales.

La especie *Pinus oocarpa* entre otros es una de las coníferas más cultivadas en nuestra región, de su follaje se puede extraer cierta cantidad de aceites esenciales⁽¹⁾, los cuales son usados en la industria cosmética y farmacéutica principalmente. La extracción de estos aceites se realiza por arrastre con vapor de agua con el fin de obtener los compuestos más livianos. Para lo cual se diseñó un equipo de extracción de aceites esenciales construido en acero inoxidable, optimizando las condiciones de trabajo como las presiones en la caldera y el recipiente de muestra, tamaño de partícula del follaje, tiempo de extracción, también se evaluó el rendimiento del aceite recolectado con respecto al tiempo de secado.

Para la caracterización del aceite, se realizaron pruebas fisicoquímicas tales como densidad, índice de refracción, solubilidad, punto de ebullición con el fin de determinar las características del aceite esencial obtenido. Se establecieron las condiciones instrumentales del cromatógrafo de gases como el tiempo de retención del α -pineno, temperatura del inyector, temperatura del detector, rampas de temperatura en el horno, flujo óptimo del gas de arrastre y finalmente la cuantificación del analito, a su vez se implemento una metodología que permitió analizar otros aceites esenciales naturales.

Los resultados que se obtuvieron de la investigación serán de gran utilidad para una posible industrialización de los aceites esenciales de Pino y otras especies cultivadas en la región. También derivarán otros proyectos de investigación relacionados con la profundización de esta investigación.

INTRODUCCIÓN.

Tal vez no existe un campo de investigación de mayor importancia en los países subdesarrollados, como el estudio de sus recursos naturales, que nos permitirá centrarnos en la realidad que nos rodea.

La utilidad de los procesos técnicos de aislar constituyentes químicos de las plantas, como los estudios de sus formulas, estructuras y propiedades químicas, farmacológicas entre otras permite la inter-relación con disciplinas como bioquímica de plantas, biogénesis de los compuestos naturales, taxonomía química, farmacología, química estructural, uso y aplicación de los compuestos en procesos industriales⁽²⁾. Los aceites esenciales (A.E.) hacen parte de estos constituyentes químicos, que se encuentran muy difundidos en el reino vegetal, principalmente en las fanerógamas, repartidas en unas 60 familias, de estas las más importantes son: Compositae, Labiatae, Myrtaceae, Rosáceae, Rutaceae y Umbeliferae ⁽³⁾.

Los A.E. se encuentran en un determinado órgano vegetal, ya sea en flores, hojas, frutas, semillas, raíces o en toda la planta. Estos los encontramos como mezclas complejas volátiles cuya composición es de terpenos, sesquiterpenos, alcoholes, aldehídos cetonas, ácidos y esterres; junto con otros restos no volátiles constituidos por alcanfores y materiales céreos. Su utilidad se limita a la perfumería, a la fabricación de licores, barnices, pinturas, cremas y productos farmacéuticos⁽⁴⁾.

El *Pinus oocarpa* es un árbol de hasta 25 metros, presenta hojas (aciculas) alargadas como agujas en grupos de 5 y pocas veces de 3 a 4 de color verde claro. Su principal producto no maderable es la resina, pero también se extraen aceites esenciales (esencia de trementina) de la resina y de sus hojas.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El término biomasa se refiere a toda la vegetación de la tierra y a muchos productos y coproductos que provienen de ella. La biomasa es la fuente de energía renovable más antigua, los humanos la utilizan desde que se descubrió el fuego. Los recursos locales de biomasa comprenden desechos agrícolas, forestales, una parte de los desperdicios sólidos municipales y desechos industriales.

En Colombia existen varias empresas productoras de papel, algunas de ellas lo fabrican a partir de material reciclado, otras como Smurfit Cartón de Colombia, lo fabrican a partir de madera que proviene de bosques cultivados por sí mismas.

El follaje es obtenido en grandes cantidades considerando que las podas a los árboles se realizan dos veces antes de la operación de tumba y que después de esta operación las hojas son retiradas de los árboles y dejadas en el suelo como desecho, ya en el proceso de tala de los bosques, los volúmenes que se producen diariamente de residuos son muy grandes, tanto de follaje y corteza. Estos residuos forestales que comprenden la madera subutilizada y los residuos de tala, árboles imperfectos y árboles no comerciales, ya no tienen aplicación alguna. En la mayoría de los casos estos residuos son abandonados en los mismos terrenos de producción, donde se pueden generar incendios, afectando el medio ambiente, o están siendo acumulados en lugares no apropiados y por su elevada humedad son lábiles a diversos procesos de fermentación y descomposición, ocasionando problemas graves de contaminación.

Tan solo en el departamento del Cauca existen más de 14000 hectáreas de bosques cultivados ubicadas en los municipios de Cajibío, Popayán, Timbío y Sotara entre otros, de los cuales es conveniente pensar en obtener mayores beneficios a partir de la actividad forestal, optando por un aprovechamiento integral de sus principales residuos.

2. OBJETIVOS.

2.1 OBJETIVO GENERAL.

Obtener aceites esenciales del follaje de la especie *Pinus oocarpa* mediante el proceso de arrastre con vapor a escala piloto e identificar de uno sus principales componentes (α - pineno) por Cromatografía de Gases como técnica analítica.

2. 2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

2.2.1 Optimizar las condiciones experimentales de extracción de los aceites esenciales.

2.2.2 Determinar los porcentajes de rendimiento en la extracción del aceite esencial.

2.2.3 Determinar las características fisicoquímicas del aceite obtenido.

2.2.4 Implementar una metodología analítica que permita la determinación de α - pineno por Cromatografía de Gases.

3. JUSTIFICACIÓN.

De la actividad forestal realizada por las empresas del sector agroforestal se obtienen, además de materias primas destinadas a la obtención de pulpas para la fabricación de papeles, cartones, y materias primas utilizadas en construcciones, material de desecho como cortezas de árboles, y hojas de pino, y eucalipto, siendo este follaje un residuo del cual se pueden obtener aceites esenciales que poseen un alto valor comercial, por las diferentes aplicaciones, que tienen en la industria farmacéutica, cosmética y de productos de limpieza.

Una alternativa para el aprovechamiento del follaje de las diversas variedades cultivadas en el sector agroforestal es someter dicho material a un proceso de extracción de aceites esenciales que le dé valor agregado, con lo cual se optimizan los recursos forestales con los cuales cuentan las empresas.

Lo anterior puede producir efectos económicos favorables, ya que los recursos que antes eran considerados como desecho en el sector forestal, como es el caso del follaje, pueden dar paso a una nueva actividad económica que generaría no solo mayores ingresos al sector forestal, sino empleo constante que garantizaría el incremento en el nivel de vida de las comunidades en donde se encuentran las plantaciones⁽⁵⁾.

Es por esta razón que se hace necesaria la optimización de la destilación de los aceites esenciales de *Pinus oocarpa*, por parte del nuestro grupo de investigación en Química analítica Ambiental, para la caracterización de los componentes del mismo, empleando la cromatografía de gases. Esto permitirá establecer los parámetros necesarios con el fin de evaluar la factibilidad de explotación y comercialización.

4. ASPECTOS TEORICOS Y ANTECEDENTES.

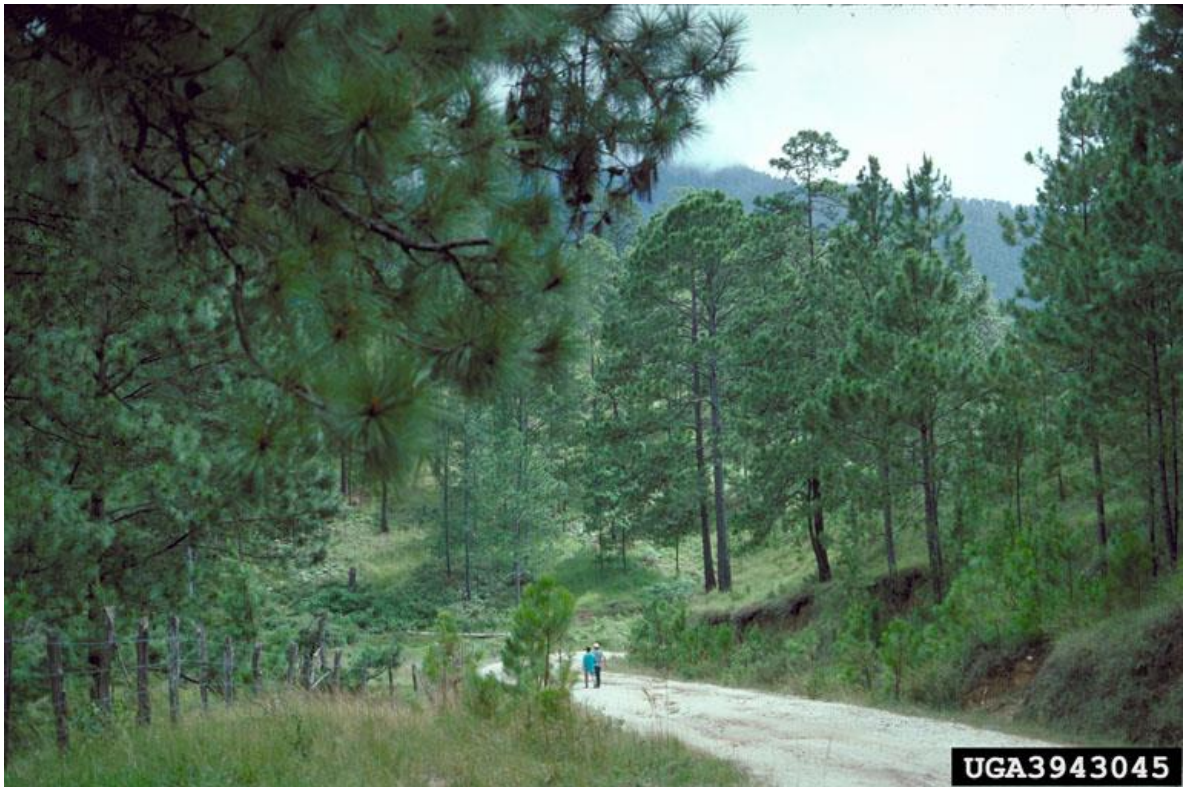
La actividad principal del sector agroforestal es la producción de pulpa para la elaboración de papel. Esta deja como residuo gran cantidad de biomasa (follaje, corteza y aserrín) que queda concentrada en el sitio de la tala. Estos residuos provienen de los cultivos de *Pinus oocarpa*, *Pinus patula* y de *Eucalyptus grandis* que son las principales especies que se cultivan en la región del Cauca.

El *Pinus oocarpa* es un árbol endémico de América central, principalmente de México, Guatemala, Honduras y El Salvador, llega a medir de 18 a 25 metros de altura por 40 a 75 cm. de diámetro en el tronco. Con la copa por lo común redondeada y frecuentemente compacta; ramas fuertes y extendidas; corteza agrietada, oscura o grisácea, con placas delgadas, largas y casi rectangulares de color amarillento interiormente. Ramillas morenas, ásperas al principio y después escamosas, desapareciendo la aspereza debido a la caducidad de la base de las brácteas. Hojas en grupos de 5, pocas veces de 3-4 en algunos fascículos, de 17-30 cm., aglomeradas, anchamente triangulares de color verde claro, brillantes, tiesas y ásperas, rara vez suaves y flexibles, bordes finamente aserrados. Vainas persistentes de color castaño oscuro, de 20-30 mm y con escamas acuminadas. Semillas pequeñas, alargadas y oscuras de 7 mm, con alas de 10-15 mm, oscuras también, engrosada en su base. Madera suave y algo ligera de textura uniforme y de color claro con tinte amarillento⁽⁶⁾. La figura 1 muestra el bosque de *Pinus oocarpa*.

Un estudio realizado al contenido del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* (*paico*) en la Universidad Nacional del Nordeste (Argentina) muestra que la extracción de los aceites esenciales del paico se realiza con arrastre por vapor de agua y su análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas utilizando dos columnas capilares simultaneas en paralelo una con fase estacionaria de polietilenglicol y la otra de metil silicona, el gas de arrastre utilizado para las determinaciones es nitrógeno, encontrándose entre otros el α pineno (13 %), β pineno (5 %), limoneno (4 %), α -terpineno (3.5 %) y ascaridol (8.6 %) este ultimo actúa como antihelmíntico y antibacterial⁽⁷⁾.

El estudio del aceite esencial de *Eupatorium patens* en la Universidad de San Luis (Argentina) por cromatografía de gases acoplada espectrometría de masas determinó que los principales componentes son cariofileno (14.15 %), γ -muuroleno (13.47 %), α pineno (11.11 %). Para lo cual se utilizó una columna capilar DB-1 con fase estacionaria de metil silicona y nitrógeno como gas portador⁽⁸⁾.

Figura 1. Fotografía, bosque *Pinus oocarpa* finca “San Benito” municipio de Cajibío. (C).



El instituto de farmacia y alimentos de la Universidad de la Habana (cuba) realizó un estudio sobre el rendimiento del aceite esencial en *Pinus caribea morElet*. Según el secado al sol y a la sombra. Encontrándose que el follaje expuesto a la sombra contiene un mayor porcentaje de aceite esencial que el follaje expuesto al sol, y que el tiempo de exposición al sol, influye significativamente sobre el rendimiento a partir del tercer día, mientras que en el follaje expuesto a la sombra, las diferencias se hacen significativas a partir del sexto día⁽⁹⁾.

En Chile la producción de aceites esenciales extraídos del pino y eucalipto, se ha convertido en la principal fuente de ingresos para las cooperativas formadas por los habitantes de las regiones donde se cultivan estas especies, ya que poseen planta propia a nivel industrial para la producción de aceites⁽¹⁰⁾.

En la Universidad del Valle, el estudio del aceite esencial de *Eucalyptus grandis*, se llevó a cabo, extrayéndolo del follaje del árbol, utilizando la extracción con arrastre por vapor, el rendimiento obtenido fue del 1.3 % en peso. El análisis del aceite esencial se realizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas utilizando una columna HP-5 y helio como gas de arrastre. Se identifico

α -pineno (22 %), 1.8-cineol (14 %) y γ -terpineno (14 %) como sus principales componentes ⁽¹¹⁾.

4.1 Definición y localización de los aceites esenciales.

Los aceites esenciales son sustancias que se encuentran naturalmente en órganos y tejidos de diversas plantas. Se conocen también con el nombre de aceites etéreos, aceites volátiles o esencias. Constituyen los principios sápidos y olorosos de las plantas en las que existen y se hallan preformados en los tejidos o se forman como resultado de la reacción de ciertos componentes cuando dichos componentes se ponen en contacto con agua⁽¹²⁾.

La definición de aceites esenciales es restrictiva ya que excluye, tanto los productos obtenidos por extracción con ayuda de disolventes, como los obtenidos por cualquier otro procedimiento, Algunas definiciones que se citan a continuación son usuales en este campo:

- **Esencias concretas:** se obtienen por extracción de vegetales frescos, con ayuda de un disolvente.
- **Resinoides:** se obtienen por extracción, con ayuda de disolventes, de las sustancias vegetales desecadas, resinas, gomo-resinas y bálsamos.
- **Esencias deterpenadas:** se obtienen por destilación a presión reducida de una mezcla de aceite esencial y disolvente, lo que permite eliminar las fracciones mas volátiles, terpenicas, irritantes y de mala conservación.

Los aceites esenciales se encuentran, casi exclusivamente, en el gran grupo de las Espermatofitas. Además, los géneros capaces de elaborar estos principios volátiles, se reagrupan en una primera aproximación, en un número bastante restringido de familias de las Angiospermas, pertenecientes a los órdenes de las Magnoliales, Laurales, Rutales, Labiales y Asterales.

Los aceites esenciales se pueden encontrar en todos los órganos vegetales: como es lógico, en las flores (bergamota, nardo), también en hojas (toronjil, laurel) y aunque menos corrientemente, en raíces (vetiver), rizomas (jengibre), leños (Sándalo), cortezas (canela), frutos (anís) o semillas (nuez moscada). Aunque todos los órganos de una misma especie vegetal, pueden contener aceite esencial, la composición de este puede variar según su localización: así en el naranjo amargo, la esencia de azahar (obtenida de flores) es diferente de la esencia de petit grain (obtenida de las hojas) y de la esencia de Curacao (obtenida de las cáscaras).

Cuantitativamente, los contenidos en aceite esencial son muy bajos, normalmente inferiores al 1%; algunos porcentajes son excepcionales como los que se encuentran en los botones florales de clavo (15%).

Los aceites esenciales son generalmente ésteres de ácidos carboxílicos, aldehídos y cetonas, hidrocarburos alicíclicos del grupo de los terpenos encontrados en plantas aromáticas cuya característica principal es su agradable aroma y que muestran propiedades odorizantes, saborizantes y de uso farmacológico^{(13), (14)}.

4.2 Funciones de los aceites esenciales.

La volatilidad y el marcado olor de los aceites esenciales, constituyen los elementos de la comunicación química de las plantas, puesto que atraen animales los cuales ayudan en la polinización y la dispersión de las diásporas. A menudo, constituyen un medio de defensa frente a depredadores (microorganismos, hongos, insectos, herbívoros); estas acciones se facilitan por la focalización periférica de los elementos secretores. La complejidad de la composición química permite también los mensajes complejos y selectivos.

4.3 Propiedades físicas de los aceites esenciales.

Los aceites esenciales son líquidos a temperatura ambiente, muy raramente tienen color y en general su densidad es inferior a la del agua. Casi siempre dotados de rotación óptica, tienen un elevado índice de refracción. Solubles en alcoholes y en disolventes orgánicos habituales, son liposolubles y muy poco solubles en agua, son arrastrables por el vapor de agua⁽¹⁵⁾.

4.4 Composición química de los aceites esenciales⁽¹⁶⁾.

Los aceites esenciales son mezclas complejas y muy variables de constituyentes, que pertenecen de forma casi exclusiva a dos series, caracterizadas por orígenes biosintéticos distintos: la serie terpénica y la serie, mucho menos frecuente, de los compuestos arenicos derivados del fenilpropano.

4.4.1 Serie terpénica.

En el caso de los aceites esenciales, únicamente se encuentran los terpenos más volátiles, es decir cuyo peso molecular no sea demasiado elevado: monoterpenos y sesquiterpenos. La diversidad de las estructuras, se explica por la gran reactividad de los carbocationes implicados en los procesos biosintéticos.

Todos los terpenos, tienen algo en común, se puede considerar que se forman por el acoplamiento de un número entero de unidades pentacarbonadas ramificadas, derivadas del 2-metil butadieno.

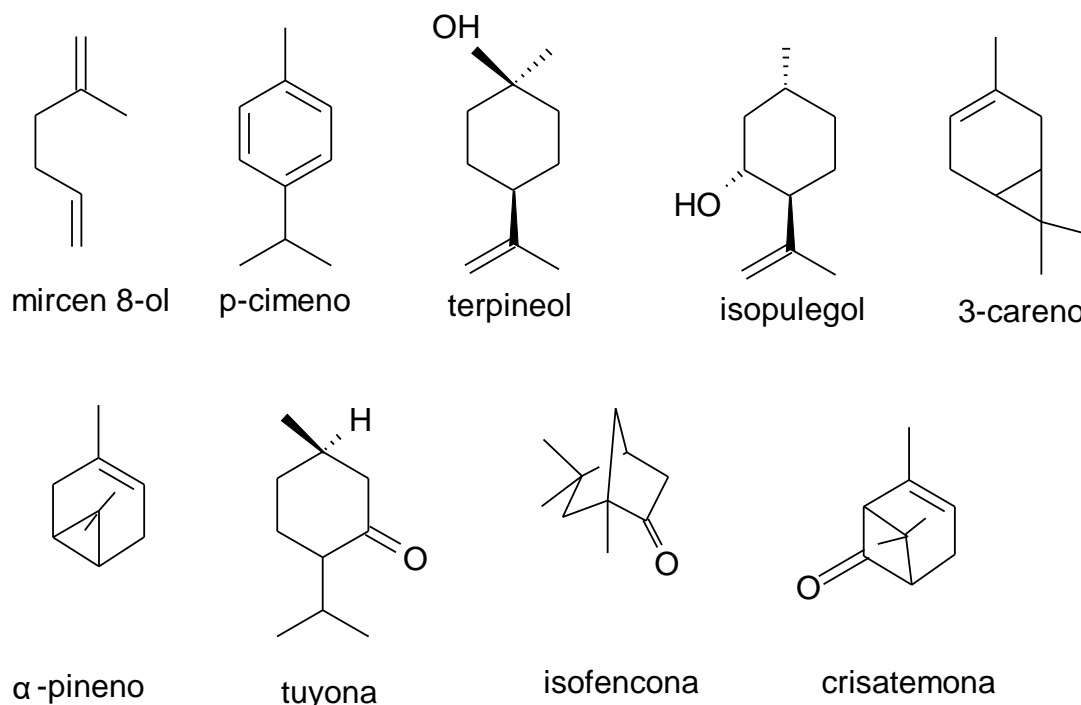
El propio isopreno no interviene en la biosíntesis, y esta regla isoprenica es por tanto teórica sin embargo tiene la ventaja de mostrar perfectamente la unidad biosintética de este grupo, y de dar cuenta de la existencia, según el número de unidades que intervengan, monoterpenos (de C₁₀), sesquiterpenos (de C₁₅),

diterpenos (de C_{20}), sesterpenos (de C_{25}), triterpenos (de C_{30}), carotenos (de C_{40}), y poliisoprenos (de $(C_5)_n$).

4.4.2 Monoterpenos.

Los principales constituyentes de esta serie son los hidrocarburos acíclicos, monocíclicos, bicíclicos o policíclicos. Van acompañados de sus derivados oxigenados: alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, éteres. La figura 2 muestra algunas de las estructuras monoterpénicas.

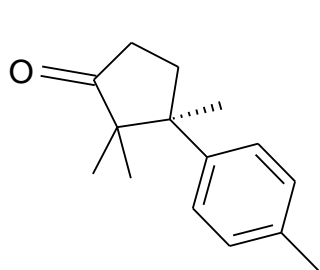
Figura 2. Algunas estructuras monoterpénicas.



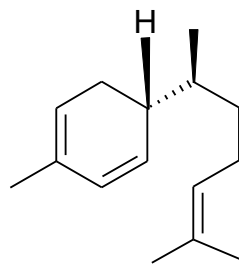
4.4.3 Sesquiterpenos.

La cadena, al aumentar el número de ciclaciones y de modificaciones posteriores posibles, crece de manera espectacular, lo que explica que estén descritos más de un millar de compuestos, relacionados con una centena de esqueletos (figura 3).

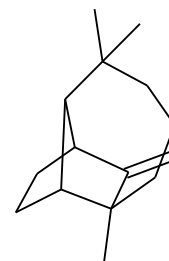
Figura 3. Algunas estructuras de sesquiterpenos.



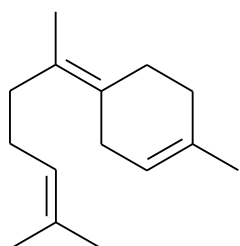
β -cuparenona



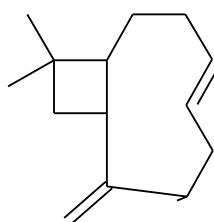
α -zingibereno



longifoleno



bisaboleno



cariofileno

4.5 Factores de variabilidad de los aceites esenciales.

4.5.1 Origen botánico.

La composición de un aceite esta en función de la especie productora y con ella, un mayor porcentaje de un compuesto en particular. Así por ejemplo, una esencia de tomillo puede provenir de *Thymus vulgaris* L, especie con timol, en la esencia de *Thymus capitatus* Hoff se encuentra el carvacol, que es el tomillo de Creta, también en la esencia de *Thymus zygis* o tomillo de España con borneol.

4.5.2 Quimiotipo.

Una misma planta puede secretar esencias muy diferentes desde el punto de vista bioquímico. De estas variaciones de composición de los aceites esenciales surge la noción de quimiotipo. En el tomillo se pueden distinguir el de los carrascales del sur de Francia (*T. vulgaris*), especie vegetal botánicamente homogénea y cariologicamente estable, siete quimiotipos con timol, carvacol, geraniol, linalol, α -terpineol, α - trans - tujanol, y 8-cis- mircenol; teniendo en cuenta que esta variación depende tanto de las condiciones ambientales y como del suelo.

4.5.3 El ciclo vegetativo.

Para una especie dada, la proporción de los diferentes constituyentes del aceite esencial, puede variar de manera importante a lo largo de su desarrollo. Así, en la *Menta piperita L*, el neomentol y la mentona que predominan al comienzo del periodo de floración, disminuyen posteriormente, el catabolismo de estos derivados da lugar a la acumulación de mentol y de un compuesto no volátil, el glucósido de neomentilo.

4.5.4 Factores del entorno.

Las condiciones climáticas y la naturaleza del suelo, influyen directamente en la producción del aceite esencial, lo mismo ocurre con las practicas de cultivo: densidad de plantación, intensidad y modalidades de riego, utilización de abonos ⁽¹⁷⁾.

4.5.5 Procedimientos de obtención.

El producto obtenido en una hidrodestilación, raramente será idéntico al que resulte de la extracción con solventes volátiles: esto depende de la labilidad y reactividad importante de las moléculas constituyentes de estas mezclas naturales que fácilmente se isomerizan, recombinan y oxidan. El cariofileno presente en el aceite esencial hidrodestilado del clavo, no se encuentra en el obtenido por extracción con enflorado ⁽¹⁷⁾.

4.6 Biosíntesis.

Los monoterpenos y en general todos los compuestos terpenoides naturales se biosintetizan por la ruta de la acetilcoenzima a través de un intermedio común que es el ácido mevalónico. Sin embargo, recientemente se ha propuesto que algunos terpenoides no se originan por esta ruta, sino por una ruta alterna que puede involucrar piruvato, gliceraldehído-3-fosfato y un intermedio de 5 átomos de carbono: 1-desoxi-xilulosa-5-fosfato ⁽¹⁸⁾.

4.6.1 Condensación cabeza-cola de IPP y DMAPP.

El ácido mevalónico es el precursor de dos unidades básicas que dan origen a los terpenoides: el isopentil pirofosfato (IPP) y γ , γ -dimetilalilpirofosfato (DMAPP) con la participación de moléculas de ATP

Una unidad de IPP puede condensarse con muchas unidades DMAPP mediante un proceso de condensación comúnmente denominado condensación "cabeza-cola", siendo la cabeza la función pirofosfato y la cola el extremo donde están ubicados los metilos. La figura 4 esquematiza el proceso de condensación de dos moléculas de 5 átomos de carbono (IPP y DMAPP) para dar origen a una

molécula de 10 átomos de carbono: Geranilpirofosfato. Esta sustancia es el precursor inmediato de todos los monoterpenos naturales. La condensación de geranilpirofosfato con una nueva unidad IPP da origen al farnesilpirofosfato, el cual es el precursor de todos los sesquiterpenos naturales ^{(19), (20), (21)}.

4.7 Métodos de extracción.

Los aceites esenciales se pueden extraer de las muestras vegetales mediante diferentes métodos como: expresión, destilación con vapor de agua, extracción con solventes volátiles, enflorado y con fluidos supercríticos.

4.7.1 Expresión.

El material vegetal es exprimido mecánicamente para liberar el aceite y este es recolectado y filtrado. Este método es utilizado para el caso de las esencias de cítricos ^{(22),(23)}.

4.7.2 Destilación por arrastre con vapor de agua.

La muestra vegetal generalmente fresca y cortada en trozos pequeños, se coloca en un recipiente cerrado y sometida a una corriente de vapor de agua sobrecalentado, la esencia así arrastrada es posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa. Esta técnica es muy utilizada especialmente para esencias fluidas, especialmente las utilizadas para perfumería, por la pureza del aceite obtenido y porque no requiere tecnología sofisticada ⁽²⁴⁾.

4.7.3 Extracción con solventes volátiles.

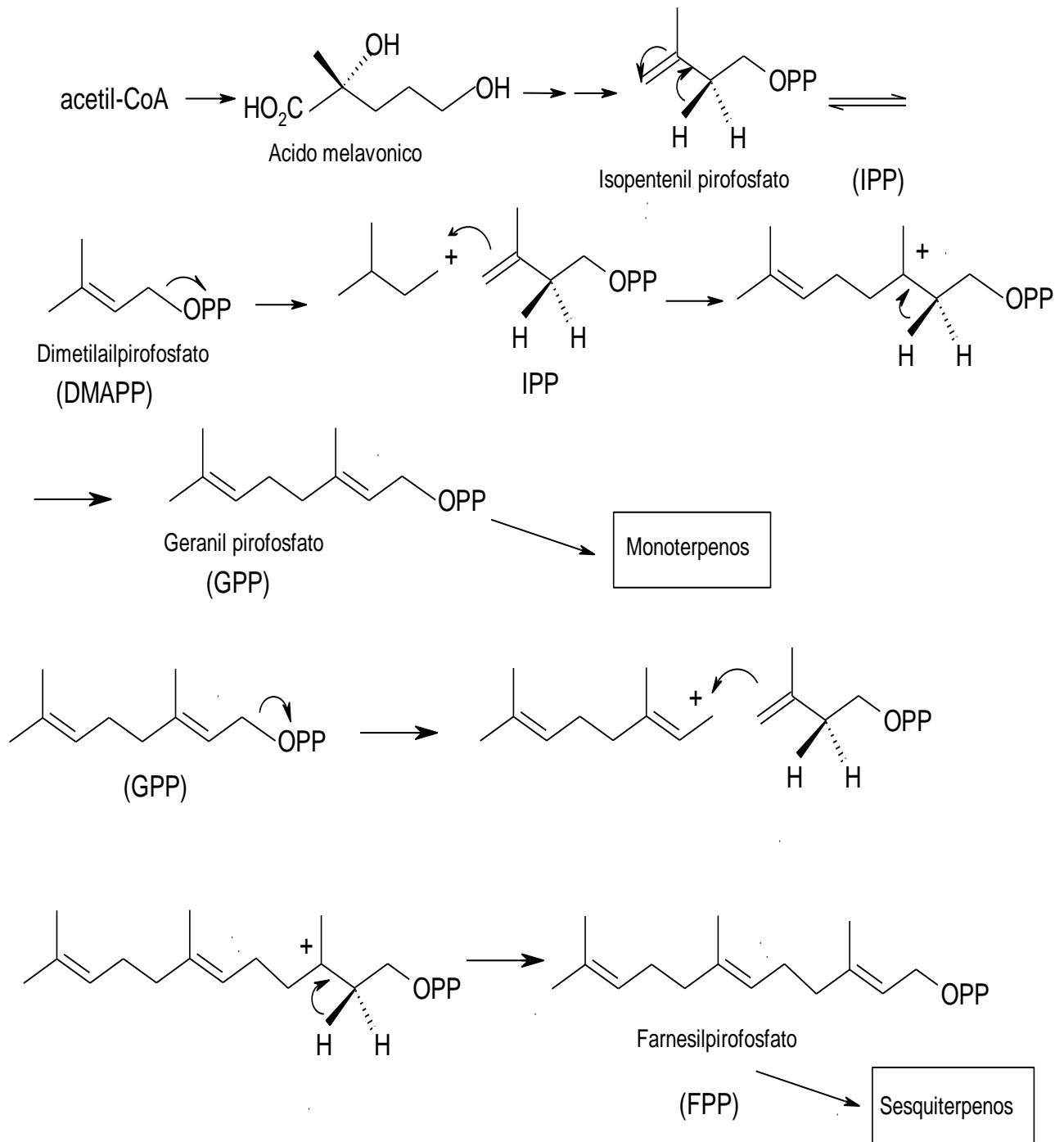
La muestra seca y molida se pone en contacto con solventes tales como alcohol, cloroformo, etc. Estos solventes solubilizan la esencia, pero también consigo extraen otras sustancias tales como grasas y ceras, obteniéndose al final una esencia impura. Se utiliza a escala de laboratorio pues a nivel industrial resulta costoso por el valor comercial de los solventes, porque se obtienen esencias impurificadas con otras sustancias, y además por el riesgo de explosión e incendio característicos de muchos solventes orgánicos volátiles ⁽²⁵⁾.

4.7.4 Enflorado o enfleurage.

El material vegetal (generalmente flores) es puesto en contacto con una grasa. La esencia es solubilizada en la grasa que actúa como vehículo extractor. Se obtiene inicialmente una mezcla de aceite esencial y grasa la cual es separada posteriormente por otros medios físico-químicos. En general se recurre al agregado de alcohol caliente a la mezcla y su posterior enfriamiento para separar la grasa (insoluble) y el extracto aromático (absoluto). Esta técnica es empleada

para la obtención de esencias florales (rosa, jazmín, azahar, etc.), pero su bajo rendimiento y la difícil separación del aceite extractor la hacen costosa.

Figura 4. Reacciones de condensación para la formación de Geranilpirofosfato y farnesilpirofosfato.



4.7.5 Extracción con fluidos supercríticos.

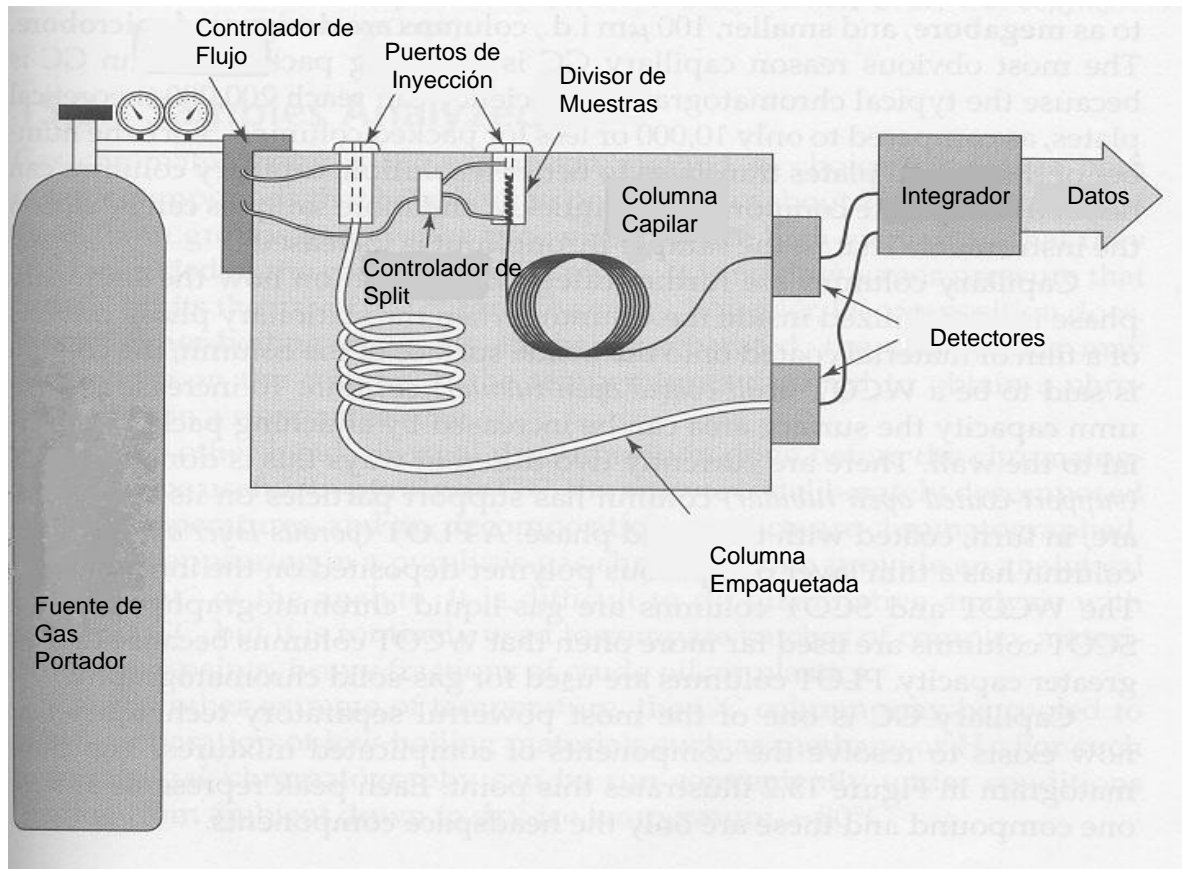
Es de desarrollo más reciente. El material vegetal cortado en trozos pequeños, licuado o molido, se empaca en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un fluido en estado supercrítico (por ejemplo CO₂), las esencias son así solubilizadas y arrastradas y el fluido supercrítico, que actúa como solvente extractor, se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente, y finalmente se obtiene una esencia cuyo grado de pureza depende de las condiciones de extracción. Aunque presenta varias ventajas como rendimiento alto, es ecológicamente compatible, el solvente se elimina fácilmente e inclusive se puede reciclar, y las bajas temperaturas utilizadas para la extracción no cambian químicamente los componentes de la esencia, sin embargo el equipo requerido es relativamente costoso, ya que se requieren bombas de alta presión y sistemas de extracción también resistentes a las altas presiones ^{(26), (27)}.

4.8 Conceptos analíticos.

La cromatografía de gases (CG) se basa en la distribución de la muestra entre dos fases; una estacionaria de extensa superficie empacada dentro de una columna y puede ser un sólido o una película que recubre el sólido, la otra fase es la móvil y consiste en un gas que percola sobre la fase estacionaria y alrededor de la misma. En la figura 5 se observa el diagrama de un cromatógrafo de gases, destacando sus partes más importantes.

En CG. La muestra se volatiliza en el inyector sobre la cabeza de una columna cromatografica. La elusión se produce por el flujo de una fase móvil que consiste en un gas inerte, y a diferencia de la mayoría de los tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito, su única función es la de transportarlo a través de la columna ⁽²⁸⁾.

Figura 5. Diagrama esquemático del cromatógrafo de gases.



4.8.1 El gas portador o gas de arrastre.

Debe tener características como:

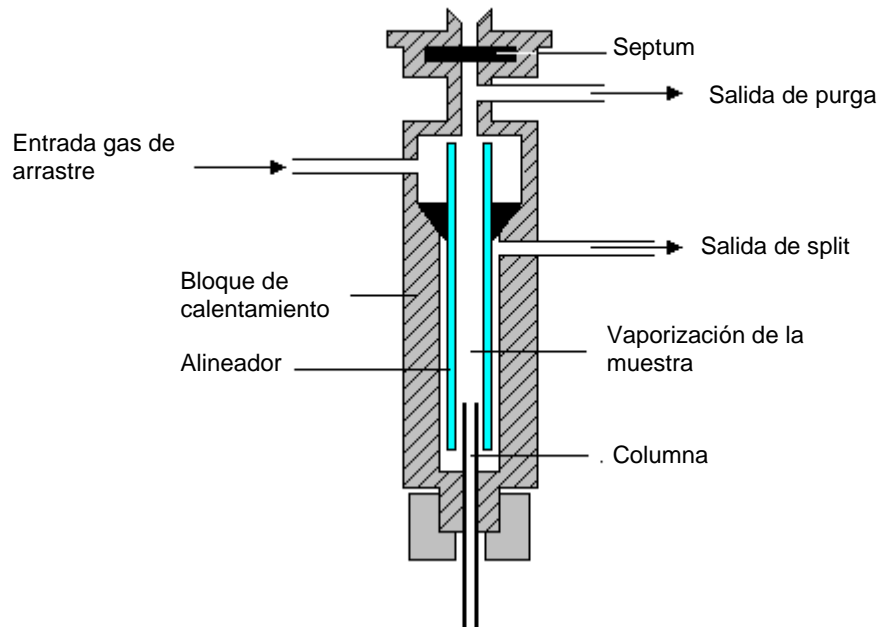
- Inerte para evitar toda interacción con la muestra o el disolvente.
- Capaz de minimizar la difusión gaseosa.
- Disponible en forma pura.
- Deseable para el detector.

4.8.2 Sistemas de inyección.

Con el objeto de introducir una muestra líquida se requiere un puerto para la muestra (figura 6), el cual contiene un tubo de vidrio dentro de un horno metálico caliente. La muestra es llevada al puerto de inyección en una jeringa a través de un sello de goma (septum), y se vaporiza en el tubo de vidrio (alineador). El gas portador lleva la muestra vaporizada hacia la columna.

Para mejorar la calidad en los análisis cromatograficos, se utilizan sistemas de inyección mas elaborados. La inyección dividida o split, consiste en un sistema neumático en el que la muestra con concentración considerable, es dividida, dirigiéndose parte hacia la columna y la otra es desechada. La inyección sin división "split less", es utilizada para analizar trazas o bajas concentraciones del analito, la mayor parte de la muestra se aplica a la columna. Se utiliza la inyección sobre la columna "on column" para muestras que pueden descomponerse al ser calentadas por encima de su punto de ebullición, para esto la solución del analito es insertada directamente sobre la columna cromatografica la cual debe estar a una temperatura menor que la descomposición del analito.

Figura 6. Sistema neumático de inyección.



4.8.3 Columnas.

En cromatografía de gases existen dos clases de columnas, las empacadas y las capilares. Estas últimas, tienen un diámetro interno menor a 1 mm y generalmente se construyen con sílice fundida. Además, dentro de esta clase de columnas, existen dos tipos, las micro empacadas y las tubulares abiertas con pared recubierta (WCOT), tubulares abiertas con capa porosa (PLOT) y tubulares abiertas con soporte impregnado (SCOT). En general las columnas tubulares, abiertas o capilares son las más utilizadas. La temperatura de la columna es una variable importante. Para un trabajo preciso se debe regular la temperatura en décimas de grado. La temperatura óptima de la columna depende del punto de ebullición del analito y del grado de separación que se necesita.

La temperatura de la columna debe ser lo suficientemente alta para que el análisis se efectúe en un plazo razonable y lo suficiente baja para lograr la separación deseada.

4.8.4 Horno.

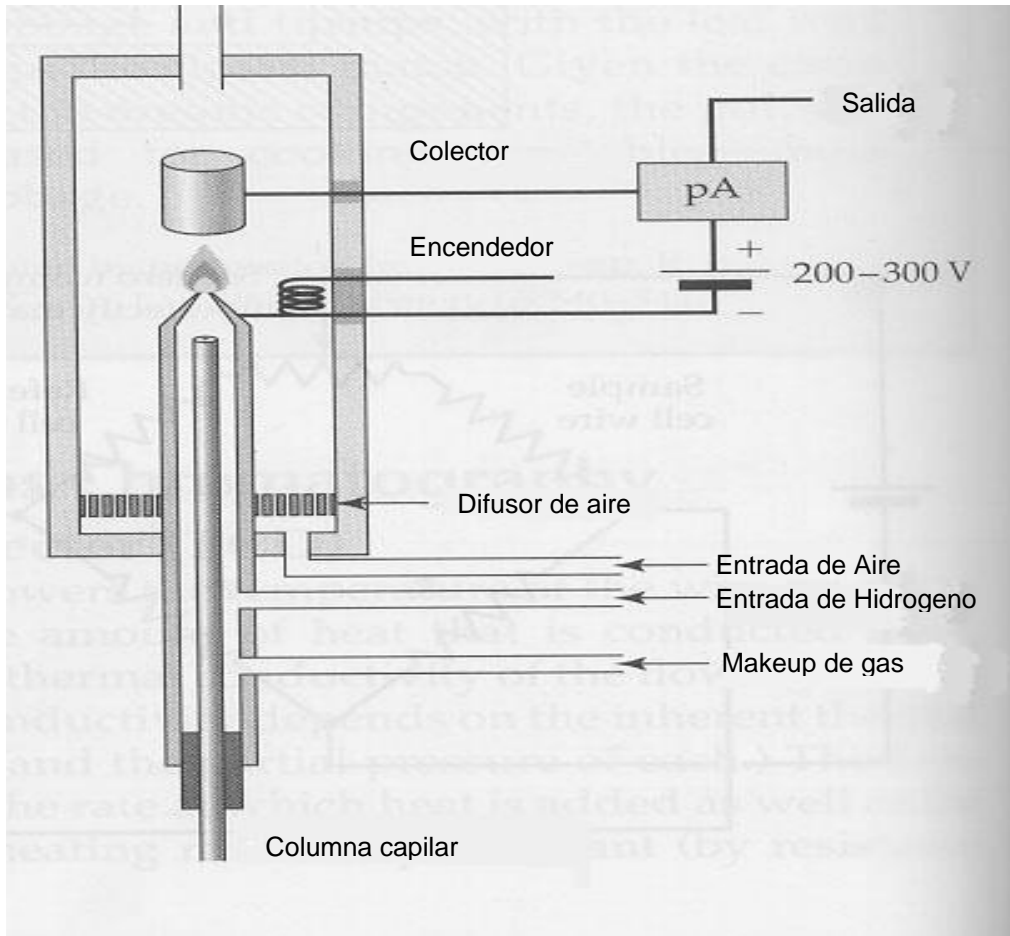
Es el encargado de calentar o enfriar la columna por medio de un sistema de flujo de aire, el cual, en la mayoría de los diseños, el cual consta de un chorro de aire que pasa a través de una resistencia de calentamiento y posteriormente por la columna, retornando después para calentarse, y así, mantener o variar la temperatura. Usualmente los hornos son construidos de acero inoxidable y poseen un amplio intervalo de velocidades para la programación de la temperatura, que a su vez, debe mantenerse constante alrededor de la temperatura deseada con una precisión de ± 1 °C en el caso isotérmico y de ± 2 °C durante programación de temperatura.

4.8.5 Detector.

Los sistemas de detección en un cromatógrafo son dispositivos que miden la concentración de cada uno de los solutos de la muestra y generan una señal eléctrica proporcional a dicha concentración. Estos sistemas deben tener un tiempo de respuesta corto que lo haga independiente de las concentraciones de los solutos enviados por la columna. En este trabajo se usó un detector de ionización de llama (FID) el cual se observa en la figura 7. Está basado en la relación directa que existe entre la conductividad eléctrica de un gas y la concentración de partículas cargadas (iones positivos, negativos y electrones) existentes en el mismo. Se utiliza una llama de hidrógeno como fuente de ionización de las moléculas orgánicas que fluyen a su través. La corriente gaseosa que sale de la columna se mezcla con una corriente de hidrógeno (combustible) y entra en el detector donde se produce la combustión.

Para soportar la llama se introduce aire por la base del detector. Durante la combustión producida al llegar un compuesto orgánico a la llama, se forman partículas cargadas, las cuales originan un flujo de corriente. Esta corriente es amplificada debidamente por los circuitos electrónicos y posteriormente se dirige al registrador ⁽²⁹⁾.

Figura 7. Detector de ionización de llama.



4.8.6 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

El cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (CG/MS) proporciona una mayor confiabilidad en la identificación de compuestos que los sistemas de detección tradicionales obteniéndose así información estructural en forma de un espectro de masas adicionalmente a la abundancia de los componentes y a los tiempos de retención de los mismos. El espectro de masas permite obtener mayor información estructural, lo que le hace ser un sistema muy versátil, ya que a excepción de algunos isómeros, un espectro de masas es único para cada compuesto.

El acople CG/MS proporciona detección universal, ya que virtualmente cualquier compuesto que sea volátil por debajo de los 400 °C puede ser detectado por el equipo. Responde a todos los tipos de compuestos: hidrocarburos, hidrocarburos halogenados, compuestos nitrogenados, pesticidas y gases. Naturalmente, la

detección de los compuestos antes mencionados depende en gran medida del tipo de columna empleada durante el análisis.

Para los aceites esenciales se prefieren columnas capilares abiertas como la HP-INOwax (Polyethylene Glycol entrecruzado), la cual se caracteriza por presentar bajo sangrado a temperaturas altas, permite un rango de temperatura de 40-260 °C, además es aplicable para alcoholes, ácidos grasos entre otros.

5. METODOLOGIA.

5.1 Materiales y Equipos.

- Balanza analítica Mettler PJ 4000 (0.1g/4000g)
- Balanza analítica Mettler AE 200 (205g/0.1mg)
- Ultrasonido Branson 1510
- Columna capilar HP-INOWax (Polyethylene Glycol) 19091N-102
- Cromatógrafo de gases Hewlett Packard serie 6890 con detector de ionización de llama.
- Filtros de nitrocelulosa para jeringa Acrodisc 0.45µm.
- Jeringa para Cromatografía de Gases, Hamilton de 10.0 µL (± 0.1)
- Septa de PTFE/goma Supelco.
- Equipo de extracción de aceites esenciales a escala piloto de arrastre con vapor.
- Estufa ACEB de 1000 w una resistencia.
- Refractómetro Karl Seiz
- Equipo de Ultravioleta –visible Intralab 2000.
- Espectrómetro de masas Hewlett Packard serie 5973.
- Equipo de infrarrojo Thermo IR 200.

5.2 Reactivos.

- Hexano grado analítico, Merck
- Metanol 99% grado HPLC, Merck
- Etanol 99% grado HPLC, Merck
- Tetracloruro de carbono, grado analítico
- Sulfato de sodio anhidro 98% grado analítico, Merck

- Eter etílico 99% grado analítico, Merck.
- α -Pinoeno, 97.1% grado analítico, $d_{20^{\circ}\text{C}} = 0.858$, Merck.
- Geraniol, 98% grado analítico, $d_{20^{\circ}\text{C}} = 0.889$, Merck.
- Helio AP Aga
- Hidrógeno AP Aga

5.3 Procedimiento para la obtención del aceite esencial de *Pinus oocarpa*.

5.3.1 Recolección y clasificación del material vegetal.

La investigación se realizó con follaje recolectado en la Finca “San Benito” municipio de Cajibío al norte del Cauca. Plantación experimental con una edad de 19 años, perteneciente a la empresa Smurfit Cartón de Colombia y manejadas por la Cooperativa Agroforestal del Cauca (Cootraforc).

Clasificación general de los bosques en estudio

Factores físicos.

- ✓ Bosque húmedo mesofítico, (semihúmedo de la zona sub-andina).
- ✓ Altitud: 1.840 msnm.
- ✓ Latitud: $2^{\circ} 31'$ (norte).
- ✓ Longitud: $76^{\circ} 35'$ (occidente).
- ✓ Temperatura: 15 a 25°C . Libre de heladas (oscilaciones máximas).
- ✓ Vientos: Ligeros o tormentas.
- ✓ La humedad de condensación atmosférica produce pluviosidad y nubosidad. El porcentaje de humedad es alto (60%).
- ✓ Precipitación: mas de 2 000 milímetros.
- ✓ Régimen de lluvias: un máximo de 4 meses sin lluvia.
- ✓ Luz: 12 horas de luz diurna.

Según la división operativa de la Cooperativa Agroforestal del Cauca Cootraforc.

La muestra de follaje fue recolectada de forma aleatoria en sacos de polipropileno. Teniendo en cuenta que el follaje de *Pinus oocarpa* presentara características físicas similares. La cantidad de muestra recolectada fue de 20 kg aproximadamente por cada muestreo. Esta se guardo en un lugar fresco y seco, para evitar el crecimiento de hongos y deterioro del follaje.

Figura 8. Follaje de *Pinus oocarpa*.



5.3.2 Obtención del aceite esencial.

El método de extracción utilizado en este estudio fue el de destilación por arrastre con vapor de agua. El equipo de destilación se preparo con antelación para cada extracción. Primero se debe calentar el calderin hasta que alcance una presión de 25 psi, luego la muestra de follaje de *Pinus oocarpa* previamente pesada se introduce en el recipiente para muestras y se abre la válvula manual hasta que la presión en dicho recipiente sea de no más de 1 psi, trabajando a una temperatura promedio de 90 °C y controlando el goteo del destilado.

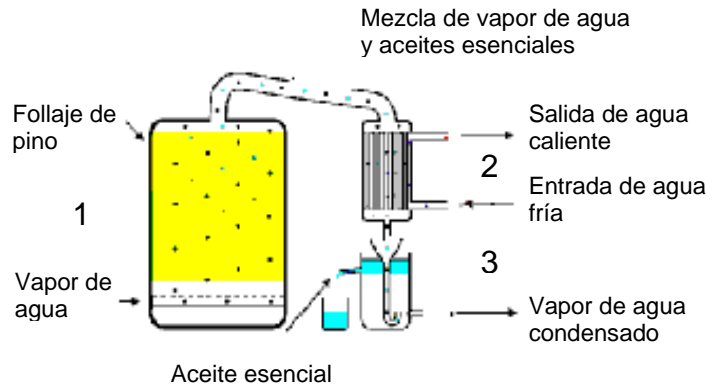
Para todas las extracciones se utilizó de 700 g a 900 g de follaje.

5.3.2.1 Tiempo de extracción.

Inicialmente se realizaron destilaciones a diferentes tiempos de extracción. 1.5, 2.0 y 3.0 horas, cada una por triplicado.

Figura 9. Esquema del equipo de destilación por arrastre con vapor de agua proyectado para la extracción de aceites esenciales a partir del follaje de *Pinus oocarpa*.

1. DESTILADOR
2. CONDENSADOR
3. SEPARADOR



5.3.2.2 Tamaño de partícula.

Se evaluó el porcentaje de rendimiento de aceite esencial contenido en el follaje de la especie *Pinus oocarpa* haciendo extracciones con la muestra molida, picada y entera, cada una realizada por triplicado.

5.3.2.3 Días de recolección y secado.

Se evaluó porcentaje de rendimiento de aceite esencial contenido en el follaje de la especie *Pinus oocarpa* haciendo extracciones a 1, 3, 5, 7, 10 y 20 días de recolectada la muestra, manteniendo el follaje protegido de los rayos directos del sol. Cada extracción se realizó por triplicado.

5.3.3 Propiedades fisicoquímicas.

Todas las muestras de A.E. obtenidas se separaron del agua por decantación, luego el A.E. se diluyó en éter etílico, se secó con sulfato de sodio y se filtró. En campana de extracción se evaporó el solvente a temperatura ambiente por 24 horas o hasta que no se percibiese olor a éter etílico.

Todas las muestras de A.E. se mantuvieron a 5 °C en refrigerador.

5.3.3.1 Densidad

Se midió tres veces en un picnómetro con capacidad para 1.0 mL de agua y se procedió a calcular de forma matemática el valor presentado por el aceite, arrojando un valor de 0.8939 g/mL.

5.3.3.2 Índice de refracción.

Con una gota de A.E. se midió una vez en un refractómetro Karl seiz a 25 °C. Obteniendo una lectura de $n_D^{25} = 1.4968$

5.3.3.3 Solubilidad.

Se probó la solubilidad de 0.1 mL de aceite esencial en etanol al 95 % y 50 %, n-Hexano, cloroformo, éter etílico, agregando la misma cantidad de cada uno de los solventes hasta que aparezca turbidez. Siendo el hexano y el éter etílico los que presentan mayor solubilidad del aceite ^{(30), (31)}, 50 mL de aceite en 100 mL de éter etílico y 25 mL de aceite en 100 mL de Hexano.

3.3.3.4 Punto de ebullición.

Se utilizó el método micro donde un tubo de ensayo con 1.0 mL de aceite esencial es calentado en un baño de glicerina, mientras dentro del tubo se pone un termómetro y un capilar atado a él ⁽³²⁾. El valor promedio de tres medidas fue de 160 °C.

5.4 Descripción de instrumentos.

5.4.1 Análisis espectroscópico y cromatográfico.

5.4.1.1 Análisis espectroscópico.

Los equipos utilizados para el estudio del aceite esencial fueron los siguientes:

- UV-VIS: Intralab 2000, utilizando hexano grado analítica.
- IR : Thermo IR 200, utilizando pastillas de KBr.

5.4.1.2 Análisis por cromatografía de gases.

Se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 6890 series con detector F.I.D. y acoplado a un espectrómetro de masas Hewlett Packard 5973, este último operado a 70 eV.

La columna utilizada fue una Hewlett Packard HP-INOWax 19091N-102 de 25m, 0.21mm de DI.

5.4.1.3 Estandarización de la metodología analítica.

Se preparó una solución estándar de referencia de 1000 ppm a partir de 11.32 μ L de α -pineno y se diluyó con n-hexano en un balón aforado de 10.0 mL. También se preparó una solución estándar de referencia para el patrón interno de 1000

ppm, midiendo 11.39 μL de Geraniol y diluyéndolos con n-hexano hasta 10.0 mL en un balón aforado.

Se fijaron las condiciones óptimas de trabajo para la columna HP-INOWax, tales como flujo del gas de arrastre y temperatura del horno con base en la curva de Van Deemter, la temperatura del detector y la temperatura del inyector se determinaron a partir de las propiedades del aceite esencial de *Pinus oocarpa*.

5.4.1.3.1 Preparación de las soluciones patrón.

Se prepararon las soluciones por dilución del estándar de referencia, con el fin de obtener un rango de concentraciones de 1 a 10 ppm y de 10 a 100 ppm del compuesto objeto de estudio (α -Pinoeno). La concentración de patrón interno en el curva de 1-10 ppm fue de 20 ppm y en la curva de 10-100 ppm fue de 100 ppm. Estas soluciones se inyectaron tres veces, por cada concentración y a partir de los datos obtenidos de las áreas y sus respectivas concentraciones, se trazan las curvas correspondientes. Los datos obtenidos de esta manera, se utilizan para hallar el rango de linealidad del método y la sensibilidad del mismo por medio del límite de detección y cuantificación.

5.4.1.3.2 Modelo de cuantificación.

La cuantificación, en el método analítico para determinación de α -Pinoeno, se realizó mediante el método del estándar interno, siendo escogido el geraniol como tal. El factor de respuesta del pinoeno respecto al estándar interno, se determino mediante la inyección, por triplicado, de una mezcla de los dos compuestos durante tres días diferentes.

$$\frac{\text{Concentracion del soluto}}{\text{Concentracion del patron}} = Fr \frac{\text{Area del soluto}}{\text{Area del patron}}$$

Se analizó la variabilidad de la concentración de α -Pinoeno durante 1, 3, 4, 5, 7, 10 y 20 días de recolectada la muestra.

5.4.1.4 Análisis por CG-MS.

Una vez se ha estandarizado el método cromatografico se procedió a realizar la confirmación de los resultados del muestreo por medio de la CG acoplada a un detector selectivo de masas (MSD). Para ello se fijaron las condiciones de trabajo como temperatura del horno, temperatura del inyector, modo de análisis y temperatura del detector.

6. RESULTADOS Y DISCUSION.

El equipo de destilación por arrastre con vapor fue construido, en acero inoxidable, este equipo cuenta con una fuente de calor que opera con energía eléctrica para generar vapor en la caldera. La caldera es una autoclave provista de un manómetro y una válvula reguladora de vapor que se opera manualmente y una válvula de seguridad calibrada a 30 psi. El recipiente de la muestra esta construido en acero inoxidable, totalmente hermético, este tiene un manómetro con el cual se vigila la presión de vapor que circula por la muestra y una válvula de seguridad calibrada a 10 psi, esta diseñado de tal forma que se puede desmontar fácilmente del intercambiador de calor y la caldera. El intercambiador de calor va conectado por uno de sus extremos al recipiente de muestras, el otro extremo llega hasta el decantador.

Se determino que el equipo debe operar con las siguientes condiciones: La presión de vapor de agua en la caldera debe estar a una presión de 25 psi, y la presión de vapor en el recipiente para muestras debe ser 1 psi, con el fin de estabilizar el conjunto caldera - recipiente de muestras y evitar arrastre de sustancias indeseables.

6.1 Rendimiento del aceite esencial destilado.

6.1.1 Tiempo de extracción.

Se evaluaron los tiempos extracción de 1.5, 2.0 y 3.0 horas con la tecnica de arrastre de vapor de agua, encontrándose que el tiempo adecuado para la destilación es de 2 horas, ya que hay un rendimiento de aceite esencial de 0.179 % en peso.

Tabla 1. Resultado de la extracción de acuerdo al tiempo.

Tiempo (h)	W muestra (g)	Vol. aceite (mL)	Promedio	% rendimiento
1.5	770.30	1,38	1,45	0,157
	886.86	1,52		
	828.80	1,45		
2.0	739,87	1,45	1,46	0,179
	779,16	1,56		
	818,46	1,67		
3.0	825,48	1,7	1,67	0,180
	822,13	1,68		
	833,28	1,62		

Algunos estudios muestran que la duración de la extracción de aceites esenciales emplean entre 2 y 3 horas para la destilación. Para un tiempo de 3 horas de extracción el porcentaje de rendimiento es similar a la extracción de 2 horas y el gasto de agua y energía es mayor a este último, presentando una desventaja. Por otra parte para 1.5 horas de extracción el rendimiento es bajo comparado con los otros dos porcentajes obtenidos. Para la extracción de aceite de *Eucalyptus grandis* se emplearon tiempos desde media hora hasta nueve horas y media encontrándose que de las 2 horas en adelante el porcentaje en peso obtenido de aceite esencial se mantiene casi constante³³, teniendo un comportamiento similar al que presento la destilación del follaje de *Pinus oocarpa* en este estudio, además dos horas son favorables desde el punto de vista económico y ecológico.

6.1.2 Tamaño de partícula.

Los rendimientos obtenidos variando el tamaño de partícula se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Resultado de la extracción de acuerdo al tamaño de partícula.

Tamaño de partícula	W muestra (g)	Vol. aceite (mL)	Promedio	Rendimiento %	Observaciones
Molida	824,28	1,62	1.55	0.176	Aceite turbio con sólidos suspendidos
	751,77	1,48			
	788,03	1,55			
Picada	739,87	1,45	1.56	0.179	Aceite claro bajo en sólidos suspendidos
	779,16	1,56			
	818,46	1,67			
Entera	805,50	0	0	0	Ninguna
	805,50				
	805,50				

Podemos apreciar que para la muestra de follaje molida el rendimiento es del 0.176 % y el aceite obtenido presenta una alta turbidez, debido a que el vapor de agua arrastra las partículas mas finas de follaje, lo contrario sucede con una muestra picada donde el rendimiento es de 0.179 % y el aceite obtenido es mas claro, en este ultimo caso las acículas son divididas en fracciones de 1-2 cm de longitud, partículas que no son fácilmente arrastrables por la presión de vapor de agua.

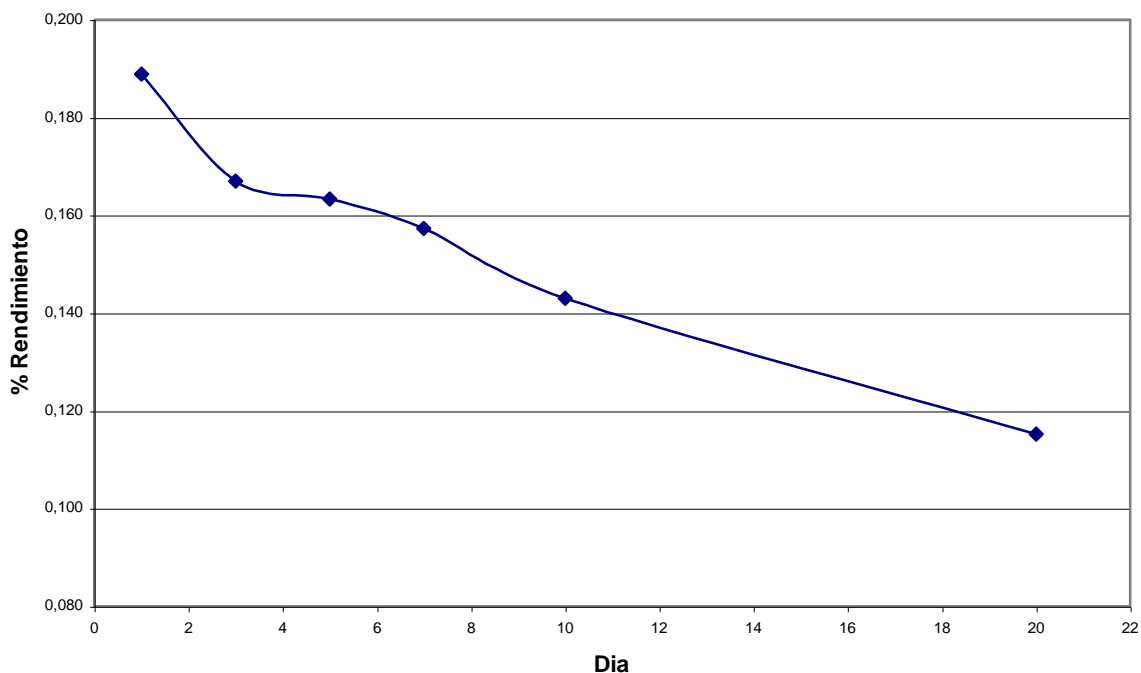
Las muestras de follaje enteras no destilaron aceite durante las 2 horas de extracción, esto se debe a que el vapor de agua no interacciona eficientemente con los tejidos de las acículas de pino, requiriéndose más tiempo para poder obtener las esencias.

6.1.3 Días de recolección y secado.

El follaje recolectado fue expuesto, protegido de los rayos directos del sol, evaluándose el rendimiento de aceite esencial de *Pinus oocarpa* de acuerdo con los días de secado.

Podemos ver entonces una tendencia descendente en la producción de aceite esencial como lo muestra la figura 10.

Figura 10. tendencia del rendimiento del aceite esencial según el tiempo de secado.



Al tercer día, el rendimiento ha disminuido en un 11.5 % respecto al volumen obtenido el primer día, para el séptimo día la pérdida llega a un 16.7 % y a los veinte días las pérdidas de aceite esencial son del 39%. La diferencia entre el primer y el quinto día son significativas; de igual forma podemos decir que para los otros días, la diferencia aumenta drásticamente respecto al primer día, por lo que productivamente es más aconsejable hacer las extracciones antes de los cinco días posteriores a la recolección de la muestra de follaje.

Este efecto puede deberse a la acción del calor ya que los aceites esenciales son compuestos volátiles, Resultados similares son discutidos por Yagodin, referido al *Pinus silvestris* L. de Liberia, quien plantea que una vez talados los árboles, el rendimiento del aceite esencial varió significativamente a partir de los tres días de exposición en las condiciones naturales de la región ⁽³⁴⁾.

6. 2 Constantes físicas.

El examen organoléptico del aceite esencial de *Pinus oocarpa* corresponde a un líquido transparente, de color amarillo pálido, viscoso y de olor agradable similar a la menta.

Los valores obtenidos de densidad e índice de refracción dan un pronóstico sobre posibles compuestos en la mezcla, en relación con las siguientes afirmaciones:

- I. $\delta < 0.9$ e $iR < 1.47$ brindan información de un alto porcentaje de hidrocarburos terpenicos o compuestos alifáticos.
- II. $\delta > 0.9$ e $iR < 1.47$ es posible la presencia de compuestos oxigenados alifáticos.
- III. $\delta < 0.9$ e $iR > 1.47$ sugiere la presencia de hidrocarburos aromáticos ⁽³⁵⁾.

El aceite destilado presenta las características físicas que se relacionan en la tabla 3.

Tabla 3. Constantes físicas del aceite esencial de *Pinus oocarpa*.

Densidad (g/mL)	Índice de refracción	Punto de ebullición (°C)	Color
0.8939	1.4968	160	Amarillo claro

El color y olor es similar al de el *Pinus montana*, el cual presenta color amarillo leve y aroma penetrante ⁽³⁶⁾, también al de la misma especie *Pinus oocarpa* reportado por Moreno ⁽³⁷⁾.

La densidad, como el índice de refracción fueron tomados a 25 °C aproximadamente, estos datos, mostrados en la tabla 4, nos dan un indicio de la presencia de algunos hidrocarburos aromáticos e hidrocarburos terpenicos en el aceite esencial de *Pinus oocarpa*.

El punto de ebullición es de 160 °C, valores de 153 °C se han reportado en la literatura para el aceite esencial de *Pinus oocarpa* obtenido del follaje por hidrodestilación⁽³⁷⁾. La diferencia en ambos casos se puede deber a la metodología de extracción, puesto que con el arrastre con vapor talvez se pueden

obtener un número mayor de compuestos. También hay que tener en cuenta que las muestras son recolectadas en sitios diferentes, con clima y suelo de composición variable entre ambos.

La composición de un aceite esencial no es la misma si se extrae con arrastre por vapor o por hidrodestilación ⁽³⁸⁾.

6.3 Solubilidad del aceite esencial de *Pinus oocarpa*.

La solubilidad del aceite esencial se probó en solventes de un rango de polaridad que va desde solventes apolares como el hexano, hasta solventes muy polares como el agua. Se tomó 0.1 mL de aceite esencial y se agregaron porciones de 0.1 mL de cada uno de los solventes, obteniéndose los resultados de solubilidad que se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Solubilidad del aceite esencial de *Pinus oocarpa*.

Solvente	Volumen Aceite (mL)	Volumen de solvente Adicionado. (mL)	Solubilidad (mL aceite en 100 mL solvente)
Agua	0.1	∞	∞
Cloroformo	0.1	0.2	50
Etanol 95 %	0.1	3.0	2.2
Etanol 50 %	0.1	4.5	3.3
Eter etílico	0.1	0.2	50
Hexano	0.1	0.4	25

De acuerdo con los resultados presentados en la tabla 5. El aceite esencial es apolar. Su solubilidad en solventes apolares como el hexano y eter etílico lo confirman, se presume entonces que la estructura química de los compuestos que componen el aceite esencial de *Pinus oocarpa* carece de grupos lo suficientemente polares para ejercer fuerzas electrostáticas que formen enlaces con el solvente. Prueba de ello es la poca solubilidad en etanol al 95 %, que es moderadamente polar y no es lo suficientemente apolar para disolver totalmente el aceite esencial, el etanol al 50 % disminuye aun mas la solubilidad del aceite debido a que el agua aumenta la polaridad del disolvente formado.

6.4 Análisis espectroscópico y cromatográfico.

6.4.1 Análisis Ultravioleta Vis.

Para transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$ las absorciones se encuentran dentro de una región espectral experimentalmente accesible (200 a 700 nm), transiciones que requieren la presencia de grupos funcionales no saturados que aporten electrones π . El espectro ultravioleta (anexo B), presenta una banda de absorción a 292.8 nm, que se puede atribuir a transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$ debidas a la presencia de cromóforos orgánicos tales como dobles enlaces conjugados y/o carbonilos alifáticos.

6.4.2 Análisis de Infrarrojo.

El espectro de vibración molecular IR (anexo C), brinda una información muy general de los principales grupos funcionales que se encuentran presentes en el aceite esencial; a continuación se relacionan las principales absorciones.

Existen dos bandas de tensión de C-H, a 2944,38 cm^{-1} que se atribuyen a vibración asimétrica y otra a 2870.80 cm^{-1} correspondiente a tensión simétrica de metilos.

Una pequeña banda a 2724.11 cm^{-1} representa absorción molecular de cicloalcanos.

Las bandas de 1643.48 cm^{-1} y 1376.57 cm^{-1} corresponden al movimiento asimétrico de flexión de metilos y flexión simétrica respectivamente. Siendo la última la más valiosa para confirmar grupos metilos ⁽³⁹⁾.

La flexión simétrica en el plano de metilenos (C-H) o tijereteo, se observa a 1455.86 cm^{-1} , esta señal puede a su vez corresponder a estiramiento C=C. También el balanceo C - H de metilenos o de flexión fuera del plano de C=C-H, se observa con una señal a 1018.28 cm^{-1} .

Una banda ancha a 3442.90 cm^{-1} nos indica la tensión de O-H asociado, en la región de 1259.48 cm^{-1} aparece otra banda de tensión de C-O de alcoholes y éteres y a 551.68 cm^{-1} una vibración fuera del plano de O-H se hace evidente.

Por último a 1708.98 una banda solapada con la señal de tensión de metilos, se debe a el estiramiento de enlace C=O.

6.4.3 Análisis cromatográfico (CG).

6.4.3.1 Estandarización de la metodología analítica.

Uno de los criterios más importantes es la selección de la columna capilar, pues se debe elegir la adecuada, en CG las más utilizadas actualmente son las capilares o abiertas, de sílice fundida en las que la fase estacionaria está retenida sobre la pared interna de la columna. La elección tanto de fase estacionaria como de fase móvil, depende de la composición de la muestra a separar, por lo que se debe tener la máxima información posible del compuesto, como puntos de ebullición, estructura, entre otros, generalmente en la separación de aceites esenciales se utilizan columnas de polietileno glicol entrecruzado ⁽⁴¹⁾.

La columna HP-INOwax (Polyethylene Glycol) fue diseñada para el análisis de aceites esenciales entre otros compuestos, esta retiene y separa de manera eficiente a aceites esenciales complejos ⁽⁴²⁾.

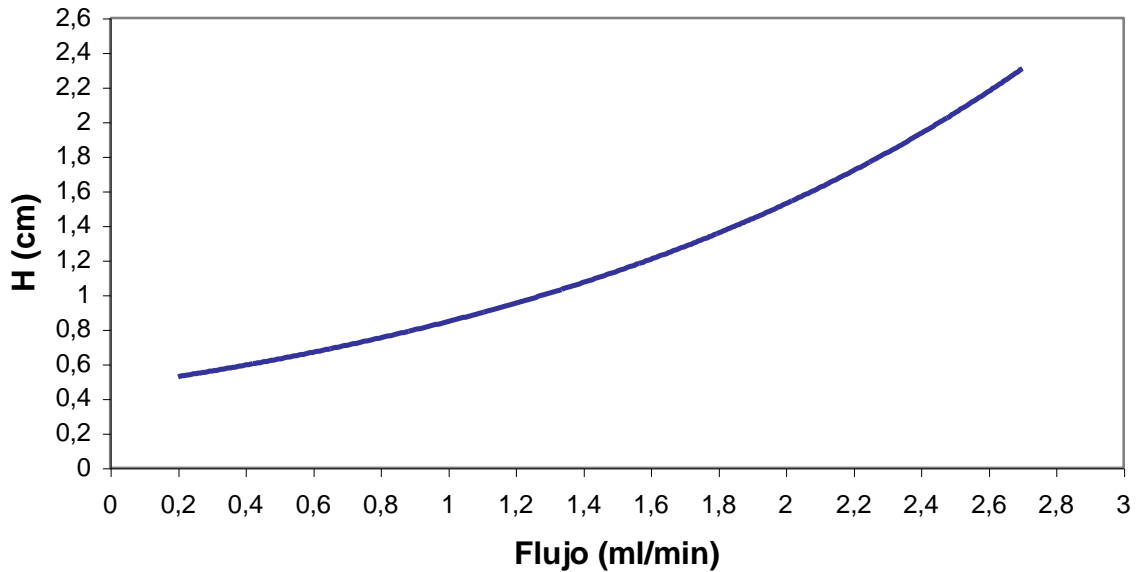
6.4.3.2 Determinación del flujo óptimo.

Se realizó la curva de Van Deemter para determinar el flujo óptimo del gas de arrastre para la columna HP-INOwax usando α -pineno en hexano como referencia.

De acuerdo con los datos obtenidos y observando la figura 11, se encuentra que el flujo óptimo abarca un rango de 0.2 a 0.6 mL/min, la curva se realizó con una rampa de temperatura de 50 °C a 150 °C, teniendo en cuenta que la temperatura de inicio no sobrepasara los 50 °C, debido a que la señal generada por el solvente es un pico ancho y se solapa con la señal del α -pineno. Se determina entonces utilizar 0.4 mL/min como flujo del gas de arrastre, por su rapidez y eficiencia.

Teniendo en cuenta la información obtenida de la curva de Van Deemter, se procedió a escoger los parámetros de trabajo más adecuados.

Figura 11. Curva de Van Deemter con α - pineno para determinar el flujo óptimo (columna HP-INOWax 25m x 0.25mm x 0.25 μ m film).



6.4.3.3 Condiciones optimas de trabajo.

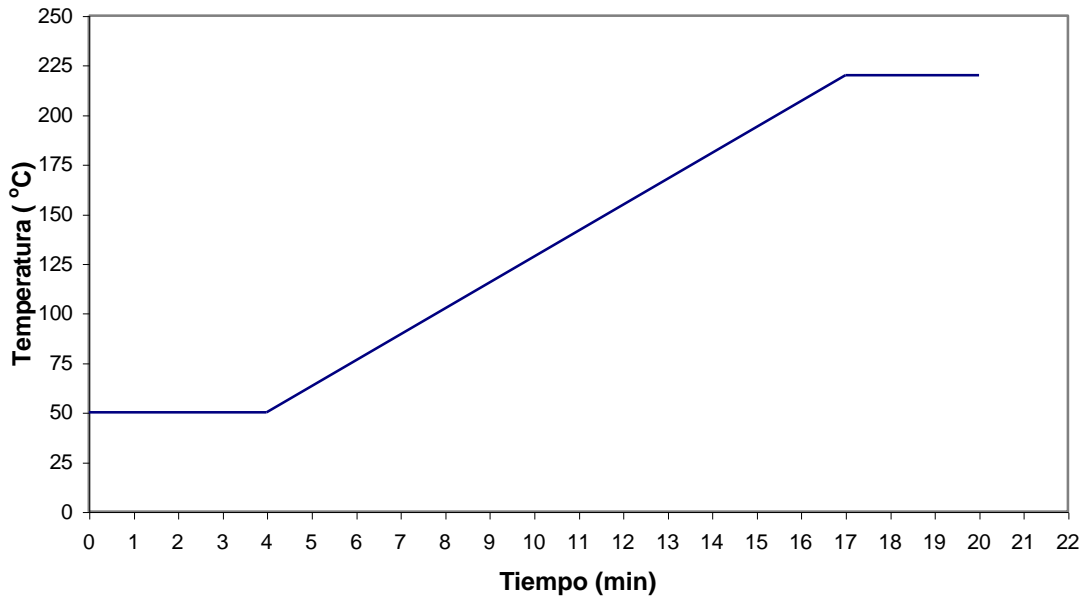
Tabla 5. Condiciones optimas de trabajo en el Cromatógrafo de Gases.

Parámetro	Condición
Volumen de inyección	0.2 μ L
Fase móvil	Helio
Temperatura del inyector	220 °C
Flujo	0.4 mL/min
Temperatura del detector	230 °C
Columna	HP-INOWax
Split	3:1

Para elegir la temperatura del inyector y el detector se tuvo en cuenta el punto de ebullición del α -pineno, para que este no se condense en el momento de inyectarse o en el caso del detector, una sobresaturación. El valor del flujo óptimo se obtiene de la curva de Van Deemter; como ya se mencionó, se determinó el valor que presente buena eficiencia y rapidez, al mismo tiempo.

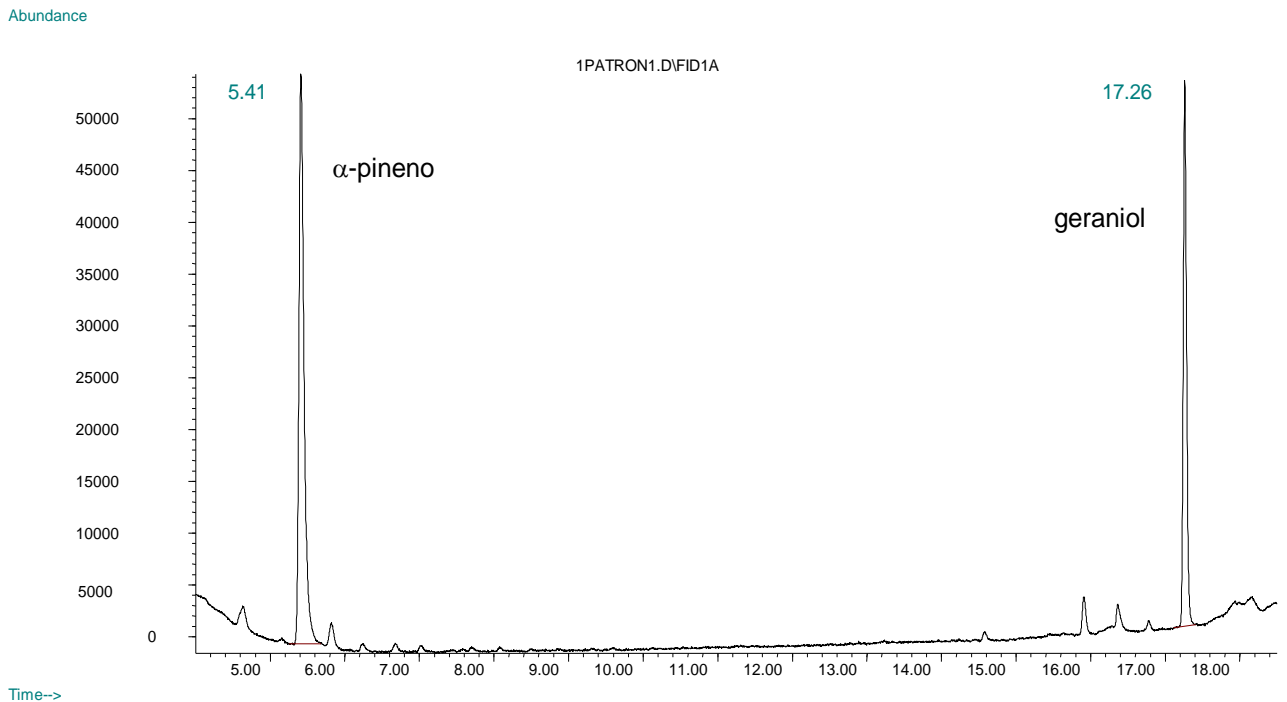
Se consiguió una buena resolución de los picos de interés, trabajando con temperaturas programadas. Como se muestra en la figura 12.

Figura 12. Rampa de temperaturas para la cuantificación de aceites esenciales.



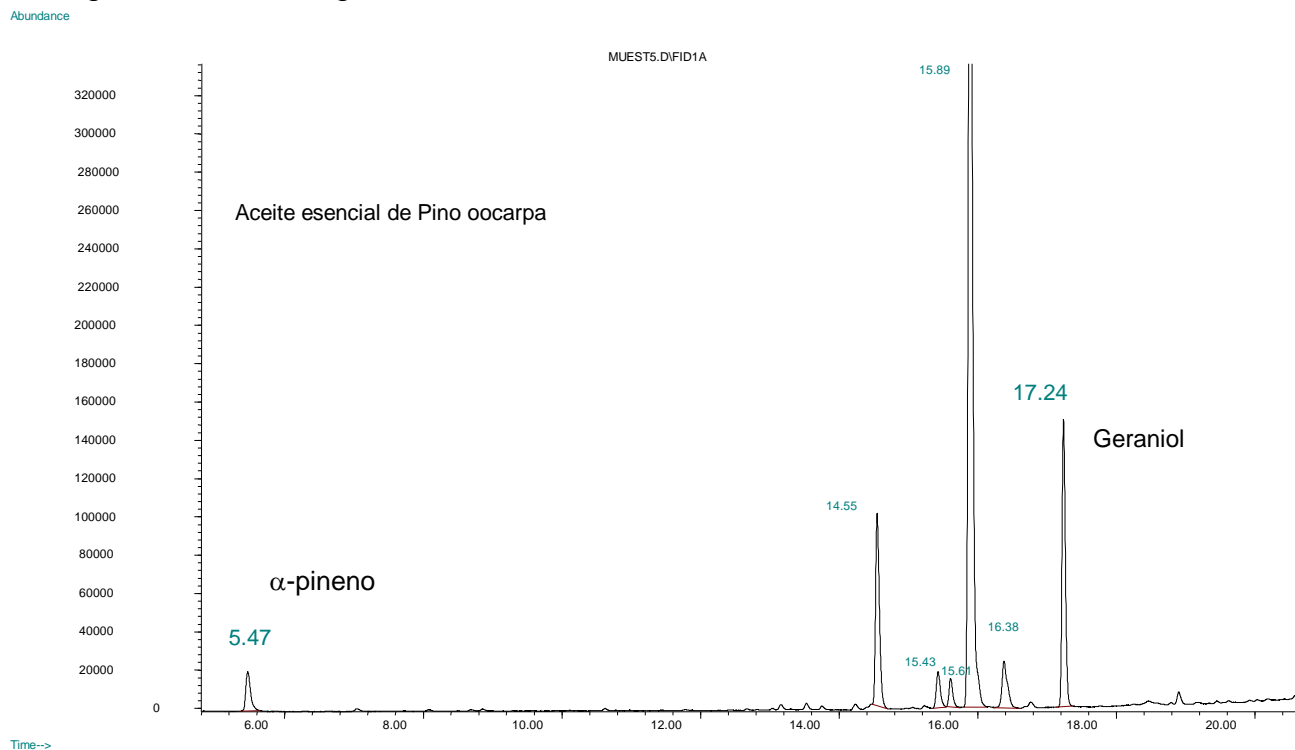
Bajo estas condiciones se obtiene un cromatograma en el cual se pueden apreciar completamente resueltos los picos del α -pineno y el estándar interno (Geraniol) tal cual se observa en la figura 13, a su vez con estas condiciones, se logra una buena separación de los componentes del aceite esencial.

Figura 13. Cromatograma de la mezcla de los patrones α -pineno y geraniol como estándar interno.



Dichos picos se encuentran muy separados, pero se hace necesaria tal diferencia con el fin de lograr cuantificar el aceite esencial α -pineno, sin que el estandar interno se sobreponga a otras señales.

Figura 14. Cromatograma del estándar interno en la muestra de aceite esencial.



6.4.3.4 Desarrollo del método analítico.

La validación del método analítico permite establecer los límites prácticos de la técnica y la metodología empleada, además de asegurar la precisión y exactitud de los datos obtenidos. Para tal efecto, se emplean los enunciados y definiciones en el anexo A.

6.4.3.4.1 Linealidad.

Esta se determinó para un rango de concentraciones de 1.00 ppm hasta 100 ppm, dividiendo este rango en dos curvas, la primera de 1.0 ppm hasta 10 ppm y la otra de 10.0 ppm hasta 100 ppm, se graficó la relación de concentraciones con relación de áreas, con un coeficiente de correlación al cuadrado (R^2) de 0.9932, y 0.9941 respectivamente. Como se muestra en las figuras 15 y 16.

Figura 15. Curva de calibración de α -pineno de 1-10 ppm.

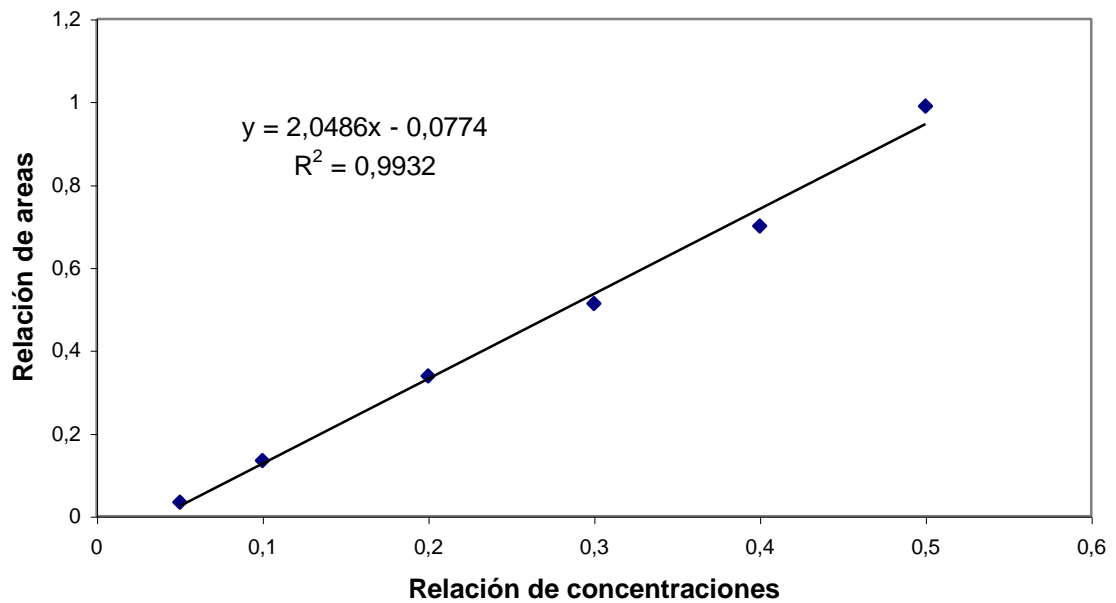
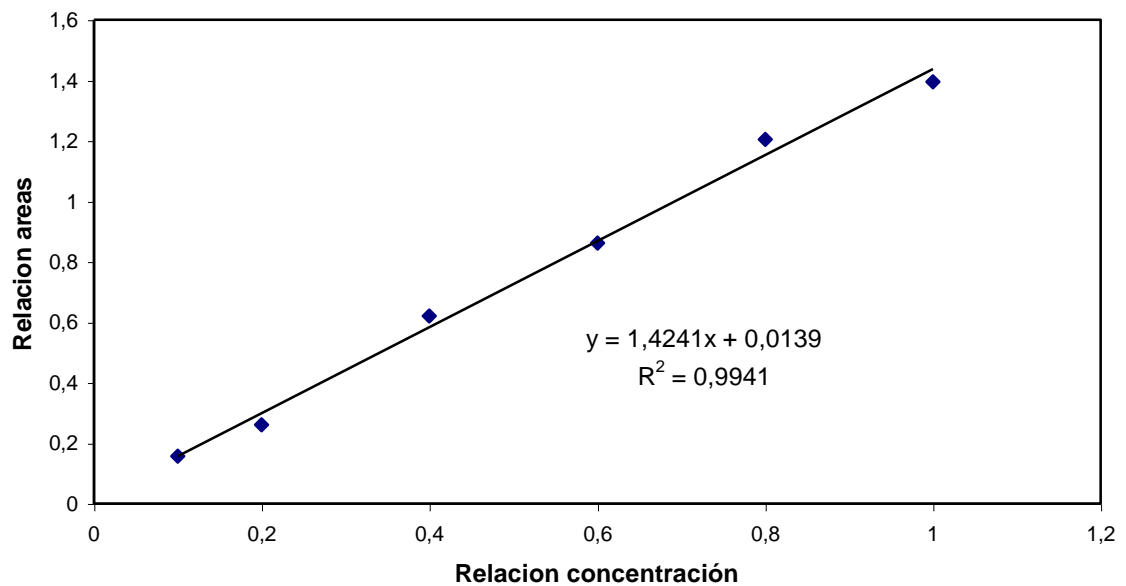


Figura 16. Curva de calibración de α -pineno de 10-100 ppm.



De acuerdo con lo anterior se demuestra la respuesta lineal del patrón en cuestión, dentro del rango de concentraciones trabajadas.

6.4.3.4.2 Sensibilidad.

6.4.3.4.2.1 Limite de Detección.

Para calcular el limite de detección (LOD) se utilizaron los datos de la curva de 1.0 -10 ppm y las ecuaciones del anexo A, obteniéndose los valores que se presentan en la tabla 6.

Tabla 6. Limite de detección para α -pineno.

Compuesto	Desviación estándar de la pendiente (S_{bl})	Valor corte ordenada (y_b)	Valor Y	Limite de detección (ppm)
α -pineno	29287	-310831	-222970	0.14

En la tabla 7 se pueden ver el limite de detección para el α -pineno el cual fue de 0.14 ppm, este valor es bajo y por lo tanto permite una buena determinación del aceite esencial en cuestión.

6.4.3.4.2.2 Limite de Cuantificación.

A partir de la misma curva y de las ecuaciones en el anexo, se procede a calcular el LOQ, obteniéndose los datos que se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Limite de Cuantificación para el α -pineno.

Compuesto	Desviación estándar de la pendiente (S_{bl})	Valor corte ordenada (y_b)	Valor Y	Limite de detección (ppm)
α -pineno	29.287	-310831	-603702	0.48

En la tabla 7 se puede ver el valor mínimo cuantificable de 0.48 ppm. Lo cual indica que el detector FID tiene una buena sensibilidad para detectar el aceite esencial de interés. A concentraciones inferiores, los valores de desviación estándar son superiores y no se da un coeficiente de correlación aceptable, afectando así la linealidad de la curva.

6.4.3.4.3 Precisión.

6.4.3.4.3.1 Repetitividad.

Para su determinación, se utilizaron las soluciones de α -pineno de la curva que fueron inyectadas cada una por triplicado. De esta manera se obtuvieron los datos que se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Datos de las relación de áreas y desviaciones estándar del α -pineno y geraniol para el rango de concentraciones de 1.0 -10 ppm

Concentración (ppm)	Relación áreas			Promedio	Desviación estándar	Desviación estándar relativa
	A1	A2	A3			
1.0	0,035	0,033	0,035	0,034	0,00076625	2,244
2.0	0,136	0,136	0,134	0,135	0,00103878	0,770
4.0	0,357	0,338	0,322	0,339	0,01452527	4,287
6.0	0,508	0,529	0,503	0,513	0,01150659	2,242
8.0	0,707	0,667	0,724	0,700	0,02387394	3,412
10	1,009	0,973	0,987	0,990	0,01508039	1,524

Se observa en los datos la tabla 8 que la desviación estándar relativa o coeficiente de variación no sobrepasa el 4.3 %, se puede decir que el método es repetitivo dentro del rango de concentraciones de 1.0 -10 ppm.

Tabla 9. Datos de las relación de áreas y desviaciones estándar del α -pineno para el rango de concentraciones de 10.0 -100 ppm.

Concentración (ppm)	Relación áreas			Promedio	Desviación estándar	Desviación estándar relativa
	A1	A2	A3			
10.0	0,154	0,156	0,162	0,157	0,00349851	2,224
20.0	0,244	0,242	0,246	0,244	0,00142168	0,582
40.0	0,618	0,626	0,617	0,620	0,00395667	0,638
60.0	0,819	0,863	0,834	0,839	0,01834329	2,187
80.0	1,191	1,191	1,230	1,204	0,01818868	1,511
100	1,400	1,395	1,387	1,394	0,0051886	0,372

La tabla 9 muestra que la desviación estándar relativa para concentraciones de 10.0 ppm a 100 ppm no supera el 2.3 %; se puede decir entonces que dentro de este rango de concentraciones, el método es repetitivo para compuestos similares al α -pineno en propiedades físicas y químicas.

6.4.3.4.3.2 Reproducibilidad.

Para tal fin, se llevo a cabo la determinación del factor de respuesta (F_R) durante tres días diferentes (cada día por triplicado), obteniéndose los datos que se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Datos para la obtención del factor de respuesta curva 1.0 a 10 ppm.

Concentración α -pineno (ppm)	Concentración Geraniol(ppm)	Área de α -pineno	Área de Geraniol	Relación de áreas	Promedio	Relación de Concentraciones	Promedio
4.0	20	1.526.074	4.273.581	0,357		0,20	
		1.519.204	4.498.545	0,338	0,339	0,20	0,200
		1.364.215	4.242.429	0,322		0,20	
4.0	20	1.357.994	4.774.747	0,284		0,20	
		1.508.621	4.991.596	0,302	0,295	0,20	0,200
		1.506.384	5.040.151	0,299		0,20	
4.0	20	1.562.284	5.005.579	0,312		0,20	
		1.519.242	5.032.232	0,302	0,307	0,20	0,200
		1.540.763	5.018.906	0,307		0,20	

Tabla 11. Datos de la desviación estándar para el factor de respuesta (F_R) curva 1 a 10 ppm.

F_R	F_R promedio	Desviación estándar del F_R	F_R	Desviación estándar del F_R	Desviación estándar relativa
0,560	0,591	0,031	0,640	0,044	6,932
0,592					
0,622					
0,703	0,678	0,022			
0,662					
0,669					
0,641	0,652	0,011			
0,662					
0,651					

Como se aprecia en la tabla 11 la desviación estándar relativa no sobrepasa el 7% para concentraciones entre 1.0 y 10 ppm, de manera que se puede afirmar que el método es poco reproducible, esto se debe a que con inyecciones manuales los valores obtenidos son muy variables, mas aun cuando las concentraciones del analito son pequeñas. Se tiene entonces que el valor del factor de respuesta para la curva de menor concentración es de 0.640 .

Tabla 12. Datos para la obtención del factor de respuesta curva 10.0 a 100 ppm.

Concentración α -pineno (ppm)	Concentración Geraniol (ppm)	Área de α -pineno	Área de Geraniol	Relación de áreas	Promedio	Relación de Concentraciones	Promedio
60	100	21.019.426	25.669.065	0,819	0,839	0,60	0,600
		22.295.266	25.830.757	0,863		0,60	
		22.873.204	27.415.241	0,834		0,60	
60	100	21.664.414	23.639.250	0,916	0,867	0,60	0,600
		23.361.545	27.975.547	0,835		0,60	
		22.900.648	26.952.766	0,850		0,60	
60	100	25.402.249	27.464.157	0,925	0,887	0,60	0,600
		22.817.412	26.006.964	0,877		0,60	
		24.720.287	28.747.750	0,860		0,60	

Tabla 13. Datos de la desviación estándar para el factor de respuesta (F_R) curva 1 a 10 ppm.

F_R	F_R promedio	Desviación estándar del F_R	F_R	Desviación estándar del F_R	Desviación Estándar relativa
0,733	0,716	0,019	0,695	0,020	2,809
0,695					
0,719					
0,655	0,693	0,034			
0,719					
0,706					
0,649	0,677	0,025			
0,684					
0,698					

Para la curva de mayor concentración, la desviación estándar relativa es de 2.81%, por lo que el método en este rango de concentraciones tiene una mayor reproducibilidad respecto al de la curva de 1.0 a 10 ppm. El factor de respuesta en este caso tiene un valor de 0.695.

6.4.3.4.4 Exactitud.

Con el fin de establecer la exactitud del método analítico, se realizó el t de student, con base en los datos obtenidos para el estándar interno.

Tabla 14. Datos para realizar el t de student.

Concentración (ppm)	Relación de áreas	Concentración obtenida	% recuperación	Desviación estándar	Recuperación porcentual promedio	Desviación estándar relativa.	t. obtenido
4.0	0,284	3,358	83,95	7,660	95,55	8,018	1,670
	0,302	3,568	89,21				
	0,299	3,529	88,22				
10	0,149	9,478	94,78				
	0,152	9,692	96,92				
	0,152	9,672	96,72				
60	0,916	65,557	109,26				
	0,835	59,735	99,56				
	0,850	60,779	101,30				

La recuperación porcentual (R) promedio se da como resultado del promedio de R de cada concentración, teniendo en cuenta que cada concentración fue inyectada por triplicado obteniéndose tres concentraciones que son promediadas para dar la concentración obtenida por curva. De esta manera el número de datos (n) es 9 y los grados de libertad son 8. Además, cabe aclarar que R corresponde a la relación de la concentración de la señal respecto del estándar preparado. El valor de $t_{obtenido}$ se deduce de la ecuación.

$$t_{obtenido} = \frac{(100-R) \sqrt{n}}{\text{Desviación estándar relativa}}$$

Para que la exactitud exista es necesario que $t_{obtenido}$ sea menor a t_{tabla} , y este último tiene un valor de 2.306 para 8 grados de libertad y un intervalo de confianza de 95%⁽⁴⁰⁾. De acuerdo a los datos obtenidos se verifica la exactitud del sistema, ya que se cumple con el parámetro establecido.

6.4.3.5 Cuantificación de las muestras de Aceite Esencial.

La cuantificación de las muestras de aceite esencial se llevó a cabo, teniendo en cuenta que las extracciones de aceite esencial se realizaron en los días 1, 3, 5, 7, 10 y 20 posteriores a la recolección de la muestra, eso con el fin de evaluar la variación de la concentración de α -pineno durante esos días.

Las muestras de aceite esencial fueron diluidas en hexano hasta obtener una concentración de 100 ppm a la cual se le agregó el estándar interno (geraniol) en una concentración constante de 20 ppm, debido a que en análisis preliminares se logró establecer que para una concentración de 100 ppm de muestra, el área que presenta la señal de α -pineno está dentro de la curva de 1 a 10 ppm.

Para el calculo de la concentración de α -pineno se utilizo la siguiente formula ⁽⁴³⁾:

$$\frac{\text{Concentracion del soluto}}{\text{Concentracion del patron}} = Fr \frac{\text{Area del soluto}}{\text{Area del patron}}$$

Se aplicó el factor de dilución para calcular el peso del analito en la muestra de aceite esencial original, ya que 11.2 μ L de aceite esencial extraído, se diluyeron a 10mL, luego 1mL de la solución preparada se diluyo a 10 mL para obtener una concentración final de 100 ppm de aceite esencial.

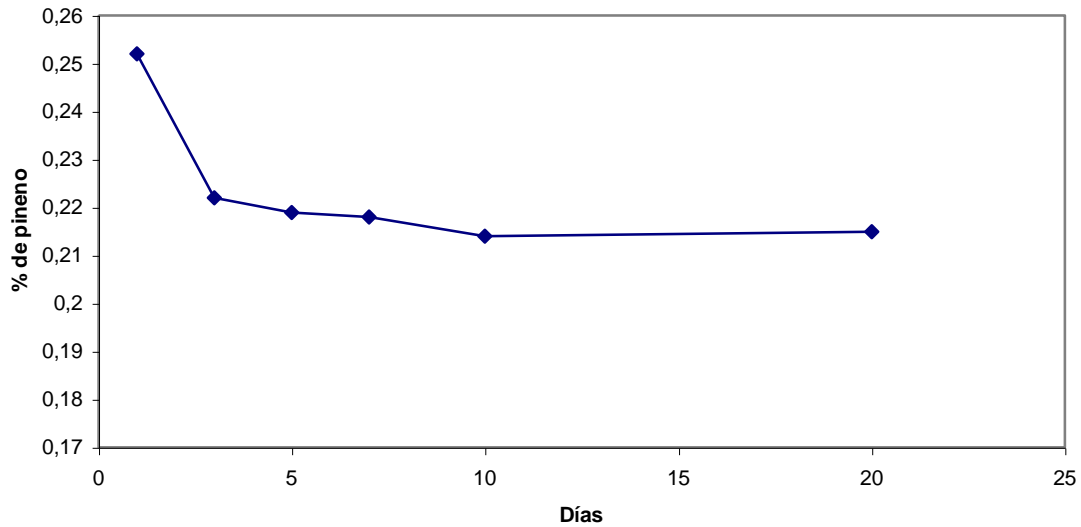
Se inyectaron entonces 0.2 μ L de solución de 100 ppm, se observa en la tabla 15, que la variación de la concentración en la muestra inyectada es poca, de la misma forma el porcentaje de α -pineno en la muestra original disminuye levemente con el pasar de los días.

Tabla 15. Concentración de α -pineno en la muestra de acuerdo con los días de secado.

Día	Área pineno	Área interno	Concentración estándar interno	Relación de áreas	Concentración pineno en muestra inyectada	% pineno en la muestra original
1	953834	4845732	20	0,197	2,52	0,252
3	819511	4725878	20	0,173	2,22	0,222
5	813495	4748738	20	0,171	2,19	0,219
7	825735	4858181	20	0,170	2,18	0,218
10	810954	4860459	20	0,167	2,14	0,214
20	817289	4873850	20	0,168	2,15	0,215

En el figura 17 se aprecia que la disminución de la concentración de α -pineno en el follaje de *Pinus oocarpa* es mas pronunciada dentro de los primeros tres días de recolectada la muestra, luego la disminución es lenta y poco significativa.

Figura 17. Variación de la concentración de α -pineno con el paso de los días.



6.4.3.6 Análisis de la muestra de aceite esencial por espectrometría de masas.

Debido a que la composición del aceite esencial de *Pinus oocarpa* no varía considerablemente, se utilizó una muestra de aceite esencial para el análisis por cromatografía de gases acoplada espectrometría de masas.

Las condiciones utilizadas para el análisis se muestran en la tabla 16.

Tabla 16. Condiciones experimentales para el análisis por CG/MS.

Parámetro	Condición
Volumen de inyección	0.2 μ L
Fase móvil	Helio
Temperatura del inyector	220 °C
Flujo	0.5 mL/min
Temperatura del detector	230 °C
Columna	HP-INOWax
Split	3:1
Temperatura auxiliar	230 °C
Temperatura del horno	50 °C x 4 min 220 (10 °C/min) 220 x 2 min

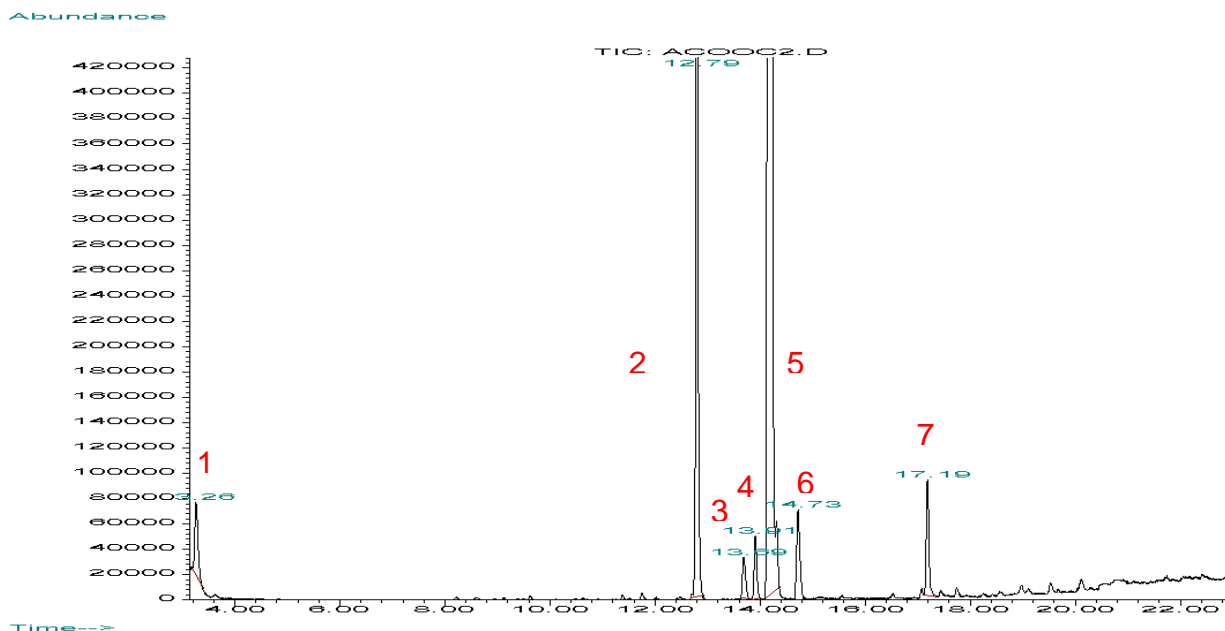
En el cromatograma se observa que el análisis tiene una duración aproximada de 2 minutos menos respecto al que se realizó con un flujo de 0.4 mL/min (Figura 18),

en él la señal del pineno aparece ahora a 3.26 min (pico 1), se puede apreciar a su vez que los picos están bien resueltos y separados.

El análisis de las muestras se realizó en modo Scan y luego se llevó a cabo la búsqueda de los iones representativos.

El espectro de masas de la señal a 3.26 min y del α -pineno, fueron comparados entre sí y con el espectro de masas del proveedor de la biblioteca que tiene el software del equipo CG/MS, arrojando una aproximación del 99 %, como se observa en el anexo D.

Figura 18. Cromatograma del aceite esencial de *Pinus oocarpa* con detector selectivo de masas.



Los principales iones y abundancias relativas del α -pineno son : 93 (100), 91 (48), 92 (39), 77 (36).

Con referencia a las demás señales, se identificaron, de la misma manera que para el α -pineno, pero se careció de los patrones para comparar. Es así como solo se tiene una aproximación del tipo de compuestos que forman el aceite esencial de *Pinus oocarpa*, a continuación se relacionan en su totalidad.

El anexo E muestra el espectro de masas correspondiente al pico 2 ubicado 12.79 min (figura 18). De acuerdo con la biblioteca del software del CG/MS, el espectro de masas corresponde al cariofileno con una aproximación del 99%.

El espectro de masas del 1,1,4,8-tetrametil-cis-4,7,10-Ciclundecatrieno, un sesquiterpeno, se asemeja al espectro de masas del pico 3 presentado en el anexo F(parte a) en un 98 %, de acuerdo con la base de datos del CG/MS. De igual manera, el espectro de masas del sesquiterpeno, 7-metil-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahidro-Naftaleno (anexo G, parte b), de acuerdo con la biblioteca del CG/MS, es similar al de la señal 4 a 13.912 min en un 98% . La señal 5 a 14.171 min genero un espectro de masas (anexo H, parte a) que se asemeja en 98% al del 1H-ciclopenta-1,3-ciclopropa-1,2-benceno, clasificado como sesquiterpeno de acuerdo con el numero de carbonos que posee. El anexo I (parte b) corresponde al espectro de masas del sesquiterpeno 1,2,3,5,6,8a-hexahidro-4,7-dimetil-naftaleno, el cual se parece en un 99% al espectro de masas de la señal 6 ubicada a 14.725 min.

La señal 7 a 17.171 min tiene un espectro de masas que es similar al del oxido de cariofileno (anexo J) en un 99%. En su orden, se puede afirmar que existe la probabilidad de que los espectros de masas obtenidos experimentalmente para cada pico del cromatograma del aceite esencial de *Pinus oocarpa* (figura 18), correspondan a los compuestos emitidos en el cotejo realizado por la base de datos del equipo de CG/MS.

Tabla 17.Composición del aceite esencial de *Pinus oocarpa*.

Pico No	Compuesto	Tiempo de retención (min)	% áreas
1	α -pineno	3.26	3,49
2	cariofileno	12.79	12,6
3	sesquiterpeno	13.69	2,46
4	sesquiterpeno	13.91	1,70
5	sesquiterpeno	14.17	74,1
6	sesquiterpeno	14.73	4,29
7	sesquiterpeno	17.17	1,29

Final mente en el aceite de *Pinus oocarpa* se identificaron 7 compuestos de los cuales solo del pico 1 se tiene la certeza de que corresponde a α -pineno, los demás compuestos son probablemente sesquiterpenos de mediano peso molecular.

De acuerdo con la tabla 17 las señales representativas en el aceite esencial de *Pinus oocarpa* son: el pico 5, correspondiente al sesquiterpeno 1H-ciclopenta-1,3-

ciclopropa-1,2-benceno (74.11 %), el pico 2 del sesquiterpeno cariofileno (12.46 %) y el α -pineno (3.49 %). Compuestos de carácter apolar, que le dan las características físicas propias del aceite.

El compuesto de mayor abundancia en el aceite presenta en su estructura un anillo de carácter aromático el cual probablemente le puede proporcionar el olor característico de la esencia, junto con el pineno que también posee cierto grado de fragancia.

7. CONCLUSIONES.

- El hexano y el éter etílico son los mejores disolventes para el aceite esencial de *Pinus oocarpa*, debido al carácter a polar del aceite esencial extraído.
- Los resultados obtenidos demostraron que con la muestra picada y dos horas de extracción, se logra un rendimiento promedio de 0.179 % reduciendo así, los gastos de agua y energía eléctrica, que no se conseguían con otros métodos.
- Se encontró que el rendimiento del aceite esencial disminuye en un 11.5 % al tercer día de recolectada la muestra, respecto al aceite esencial recolectado el primer día y que las pérdidas se hacen mas notorias entre el día siete y el día veinte. Siendo aconsejable realizar las extracciones antes de los cinco días posteriores a la recolección del follaje.
- Se concluye que el método utilizado para la cuantificación de α -pineno, es valido puesto que es lineal dentro del rango de concentraciones evaluadas, sensible con limite de detección de 0.14 ppm y limite de cuantificación de 0.48 ppm, repetitivo y poco reproducible. Teniendo en cuenta que la desviación estándar relativa esta cerca del 7% para la curva de baja concentración y que la inyección de la muestra se realizo de forma manual.
- La cuantificación del α -pineno dio como resultado que su concentración en la muestra de aceite esencial de *Pinus oocarpa* fue de 0.252 % y que esta varia muy poco con el paso de los días posteriores a la recolección del follaje.
- Se encontró que el componente mayoritario del aceite esencial del follaje de *Pinus oocarpa* es el sesquiterpeno 1H-ciclopenta-1,3-ciclopropa-1,2-benceno octahidro con un 74.0 % de abundancia, seguido de cariofileno (12,7%) y el α -pineno (3.50%).

8. RECOMENDACIONES.

- Se recomienda, profundizar en el análisis detallado de los compuestos del aceite esencial de *Pinus oocarpa* por medio de la resonancia magnética nuclear como técnica complementaria, y utilizar patrones de los demás aceites encontrados con espectrometría de masas para tener una mayor certeza del resultado.
- La cromatografía de columna es una técnica útil para aislar los componentes del aceite esencial de *Pinus oocarpa* con fines académicos y comerciales.

9. BIBLIOGRAFIA.

1. ZAPATA Angel; Quimica de los Productos Naturales. I Seminario Nacional, de Quimica de los Productos Naturales, Universidad del Valle, 1976, 21-25.
2. PEREZ ARBELAEZ E. Plantas Utiles de Colombia, 14 edición, Medellín: Victor Hugo, 1984, p 216-220.
3. MOSHONAS, M.G. y Luna, E.D. The Flavor Industry, Haylen & Son, 1970, 90-94.
4. BERRIO Jorge. Los pinos y la reforestación en Colombia, Rev. Bosques y Futuro, Enero - Abril, 1992. p 8-10
5. TEOPHILE Karin. Bosques y empleos, Arista inexplorada, Rev. Bosques y Futuro, 16 Abril – Junio, 1997. p 12
6. Especies con Usos No Maderables en Bosques de Encino, Pino y Pino-Encino. [on line]. Disponible desde internet: < <http://148.233.168.204/pfnm/amplia.html>>
7. TORRES Ana, RICCIARDI Gabriela et . Al. Examen del contenido en ascaridol del aceite esencial del *Chenopodium ambrosioides* (paico). Universidad Nacional del Nordeste, Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2003. [on line]. Disponible desde internet: <www.unne.edu.ar/cyt/2003/comunicaciones/08-Exactas/E-066.pdf>
8. BAILAC Pedro, DELLACASA Alejandro et Al. Composición del aceite esencial y actividad antimicrobiana de *Eupatorium patens*. Boletín Sociedad. Chilena de Química. Junio de 2000, v: 45, n: 2.
9. QUERT A. R. Et. Al. Rendimiento de aceite esencial en *Pinus caribea* MorElet según el secado al sol y a la sombra. Revista Cubana de Farmacia. 2001; 35 (1): 47-50.
10. Consulta de expertos sobre productos forestales no madereros para América Latina y el Caribe. [on line]. Disponible desde internet: <<http://www.fao.org/docrep/t2360s/t2360s05.htm>>
11. DARAVIÑA H. Carlos. Estudio del aceite esencial de *Eucalyptus grandis*; Universidad del Valle, Facultad de Ciencias. Octubre de 2000.

12. Definición de aceites esenciales. [on line]. Disponible desde internet: <bilbo.edu.uy/~planta/pdf/FarmacognosiaPE80/ bolilla4.pdf >
13. Composición química de los aceites esenciales. [on line]. Disponible desde internet: <http://www.geocities.com/aceites_esenciales/quimica.htm>
14. GROS G. Eduardo, POMILLO B. Alicia. Introducción al estudio de los productos naturales. Universidad de Buenos Aires, Secretaria general de los estados Americanos. Washington D.C. 1985. Pág. 79-99.
15. GUENTHER, E; The Esencial Oils, Vol I, III, V. Van Nostran. Estados Unidos. 1948.
16. BRUNETON J. Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia. Acribia. España 1991. p 233.
17. BRUNETON J. Op, cit, p 236,238.
18. Adam, K. P., Zapp, J., PHYTOCHEMISTRY 48(6) 953 (1998).
19. J Chappell, Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 46 (1995) 521-547.
20. D J Mcgarvey, R Croteau, Plant Cell 7: 7 (JUL 1995) 1015-1026.
21. K Nabeta, K Kigure, M Fujita, T Nagoya, T Ishikawa, H Okuyama, T Takasawa, Journal of the Chemical Society - Perkin Transactions 1 : 15 (AUG 7 1995) 1935-1939.
22. DOMINGEZ X. Métodos de Investigación Fitoquímica, 1^{er} Edición. Limusa. México. 1973. Pág. 231
23. MARTINEZ A. Aceites Esenciales. Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia. Medellín Febrero de 2003. [on line]. Disponible desde internet: <muisca.udea.edu.co/~ff/esencias2001b.pdf>.
24. PEREZ L. Destilación por Arrastre con Vapor y Aceites esenciales. Laboratorio de Química Orgánica 2003. Pág. 43-48.
25. DOMINGEZ X. Métodos de Investigación Fitoquímica, 1^{er} Edición. Limusa. México. 1973. Pág. 231.
26. BRUNETON J. Op, cit, p 238-240.

27. Aceites Esenciales. [on line]. Disponible desde internet: <bilbo.edu.uy/~planta/pdf/FarmacognosiaPE80/ bolilla4.pdf>.
28. HARRIS C. Daniel. Análisis Químico Cuantitativo, Grupo editorial Iberoamerica. México, 1992. p. 637-651.
29. VARCARCEL, M; GOMEZ; A. Técnicas analíticas de separación.. Reverte S.A. Barcelona. 1998.
30. DOMINGUEZ S. Xorge. Cromatografía en papel y capa delgada. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey., Secretaria General de los Estados Americanos. Washington D.C. 1982. p. 35-58.
31. DOMINGUEZ, Op. Cit. p 232.
32. FUSON C. Reynold. Identificación Sistemática de Compuestos Orgánicos; Limusa editores, México, 1995. Pág. 46-54
33. DARAVIÑA, Op. Cit. p 25.
34. YAGODIN VI. Recursos vegetales. 10 ed. Moscu: Editorial MIR, 1979: 117-124
35. DOMINGUEZ, Op. Cit. p 232.
36. THE MERCK INDEX. Tenth edition. MERCK & CO INC. New jersey 1983.
37. MORENO Paula A. Caracterización del follaje de *Eucaliptus grandis*, *Pinus patula* y *Pinus oocarpa* como materias primas para la extracción de aceites esenciales. Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Enero de 2004.
38. DARAVIÑA, Op. Cit. p 13.
39. CALDERON Carlos E. Manual para la Interpretación de Espectros de Infrarrojos. Universidad Nacional de Colombia, Bogota D. C. 1985.
40. SAMPIERI H. Roberto, COLLADO C. y BAPTISTA P. Metodología de la investigación. 2^{da} ed, Mac Graw Hill, México D.F. 1998, p 384.
41. LOURENCO P. Et al. Essential Oil from hairy root cultures and from plant roots of *Achillea millefolium*. Phytochemistry. 51 (1999), p 637-642
42. TORRES A.. Op, cit.

43. SKOOG Douglas, HOLLER J. y NIEMAN T. Principios de análisis instrumental. 5 ed, Mac Graw Hill, Madrid. 2001, p 777.

ANEXO A.

DESARROLLO DEL METODO.

Una vez se ha implementado la técnica y el método de análisis, se requiere la confirmación y validación de los resultados obtenidos para observar que cumplan con las especificaciones requeridas.

LINEALIDAD.

para poder determinar la linealidad (dentro de un rango específico), se realizaron una serie de cinco diluciones del estándar de referencia, con el fin de inyectar cada una por triplicado, y así, obtener la curva por regresión lineal, la cual tiene la siguiente forma matemática:

$$S = mc + S_{bl} \quad (1)$$

Donde m es la pendiente y S_{bl} es el intercepto con el eje Y. De esta manera se obtiene un coeficiente de correlación (r^2), el cual determina la linealidad de dicha curva.

PRECISION.

La precisión describe la reproducibilidad y repetitividad de las mediciones, es decir que tan cercanos están los resultados que se han obtenido exactamente de la misma manera.

Para describir la precisión de una serie de datos pueden utilizarse términos tales como la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV), los cuales son una función de la desviación de los datos.

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (2)$$

Donde x_i es el valor medido, \bar{x} la medida y n el número de medidas.

$$\sum_{i=1}^n x_i$$

$$\bar{X} = \frac{\quad}{n} \quad (3)$$

$$CV = (s \times 100) / \bar{X} \quad (4)$$

EXACTITUD.

La palabra exactitud indica que tan cerca esta una medición de su valor verdadero o aceptado y para determinarla se utiliza el t de Student.

Para lo anterior se tomaron tres concentraciones que correspondan al rango de linealidad de las curvas y se inyectan tres veces cada una, de manera que se obtiene un valor t_{exp} (valor de t experimental), el cual es comparado con el valor de t_{tab} (valor de t tabulado para $n - 1$ grados de libertad).

$$t_{exp} = \frac{|100 - R| \sqrt{n}}{CV} \quad (5)$$

$$R = \frac{C_{RL}}{C_{real}} \times 100 \quad (6)$$

Donde R es la recuperación porcentual, C_{RL} es la concentración obtenida por regresión lineal y C_{real} la concentración real o conocida.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, se evalúa la exactitud para el R promedio de todas las concentraciones, de lo cual debe esperarse que t_{exp} sea menor a t_{tab} para que no exista diferencia significativa con el 100 % de recuperación, y de esta forma, la exactitud es aprobada.

SENSIBILIDAD.

La sensibilidad de un instrumento o de un método, mide su capacidad de discriminar entre pequeñas diferencias en la concentración del analito, para lo cual se tiene que los parámetros para evaluar la sensibilidad del método son los límites de detección y cuantificación.

Límite de Detección (LOD).

Es la concentración o peso mínimos de analito que pueden detectarse para un nivel de confianza dado, proporcionando una señal significativamente diferente de la “señal de fondo”, lo cual se expresa matemáticamente como:

$$S_m = \hat{S}_{bl} + kS_{bl} \quad (7)$$

Donde k suele tener un valor de tres (3), S_m es la señal analítica, \hat{S}_{bl} la señal media del blanco (abscisa igual a cero) y S_{bl} la desviación estándar del mismo.

Sustituyendo S_m por S en la ecuación (2), y reordenado, se obtiene finalmente la expresión adecuada para calcular el limite de detección (LOD), representado en la ecuación (8) como C_m .

$$C_m = \frac{S_m - \hat{S}_{bl}}{m} \quad (8)$$

Limite de cuantificación (LOQ).

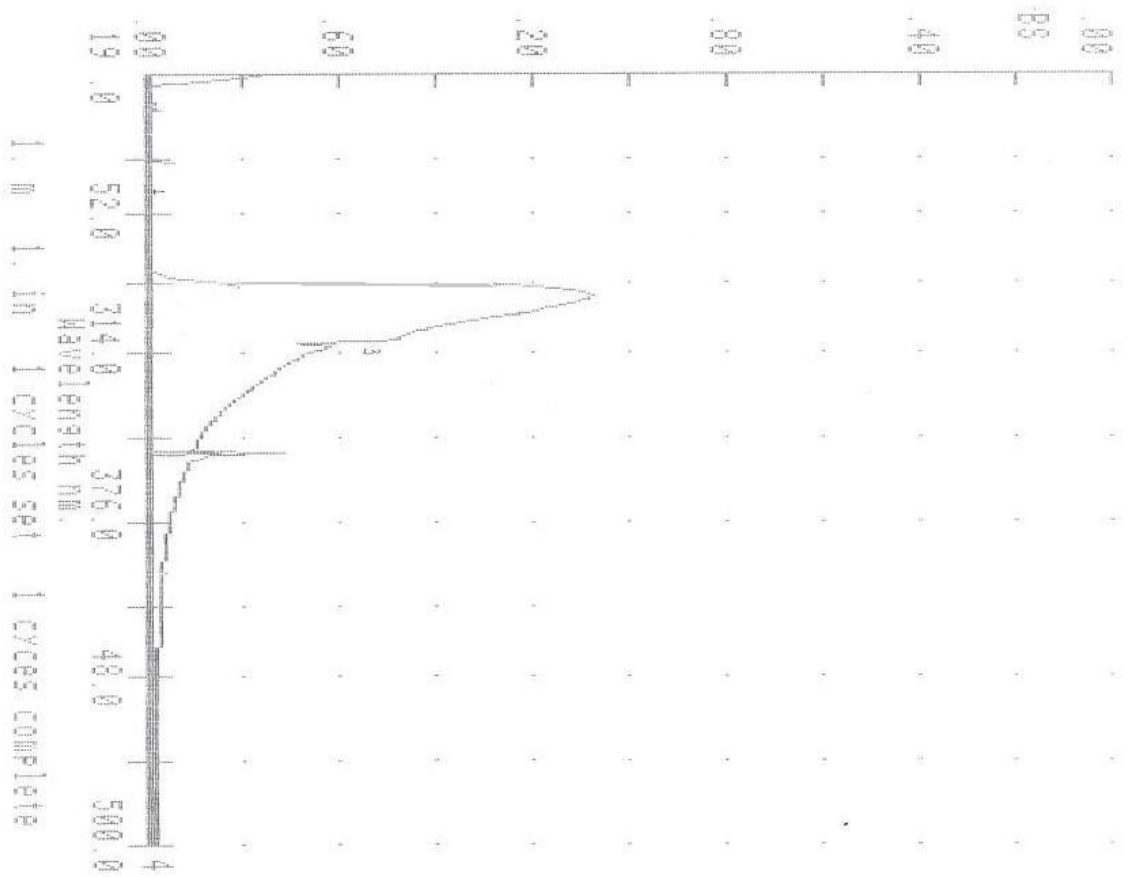
Es la concentración o peso del analito más pequeños con la que pueden analizarse medidas cuantitativas, en donde estas, se toman generalmente cuando el (LOQ) es igual a diez veces las desviación estándar del blanco. Análogamente al LOD se tiene:

$$S_m = \hat{S}_{bl} + 10S_{bl} \quad (9)$$

$$C_m^* = \frac{S_m - \hat{S}_{bl}}{m} \quad (10)$$

en donde k es igual a diez (10) y C_m^* equivale al LOQ.

ANEXO B. ESPECTRO DE UV-VIS DEL ACEITE ESENCIAL DE *Pinus oocarpa*.



Operator/Date:

Tracer: 4

Absorbance mode

Ord Min -0.000

Lower Wl 190.0 nm.

Baseline Corrected

8 Peak(s) detected

Sample Type:

Bandwidth 1.0 nm, Time Constant 0.3 sec

Ord Max 3.000 Scan Speed 100.0 nm/min.

Peak at wavelength 350.1 nm, of value 0.428

Peak at wavelength 311.5 nm, of value 0.561

Peak at wavelength 292.8 nm, of value 1.377

Peak at wavelength 272.1 nm, of value -0.041

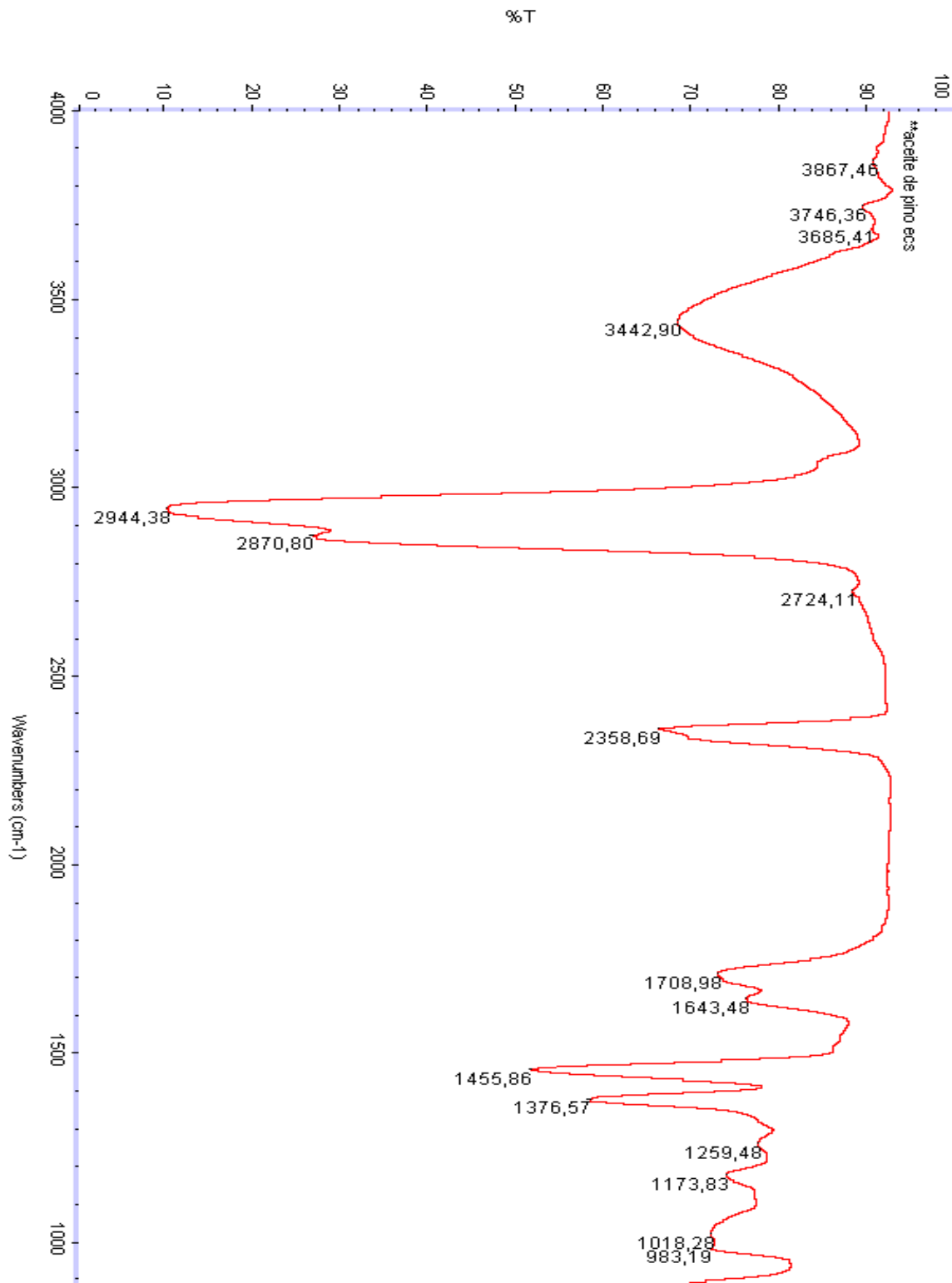
Peak at wavelength 225.9 nm, of value -0.024

Peak at wavelength 221.7 nm, of value 0.070

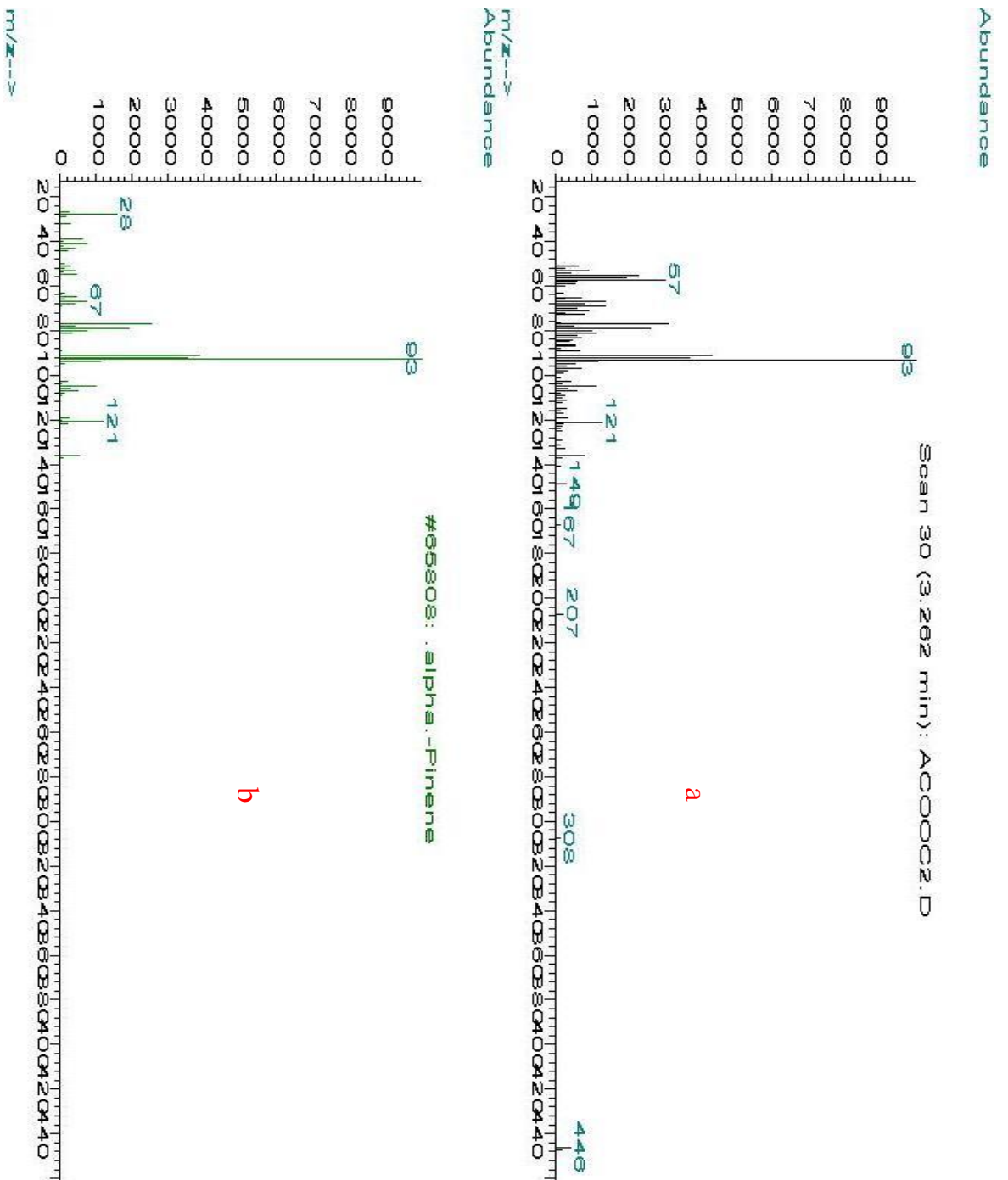
Peak at wavelength 216.2 nm, of value -0.044

Peak at wavelength 202.4 nm, of value 0.027

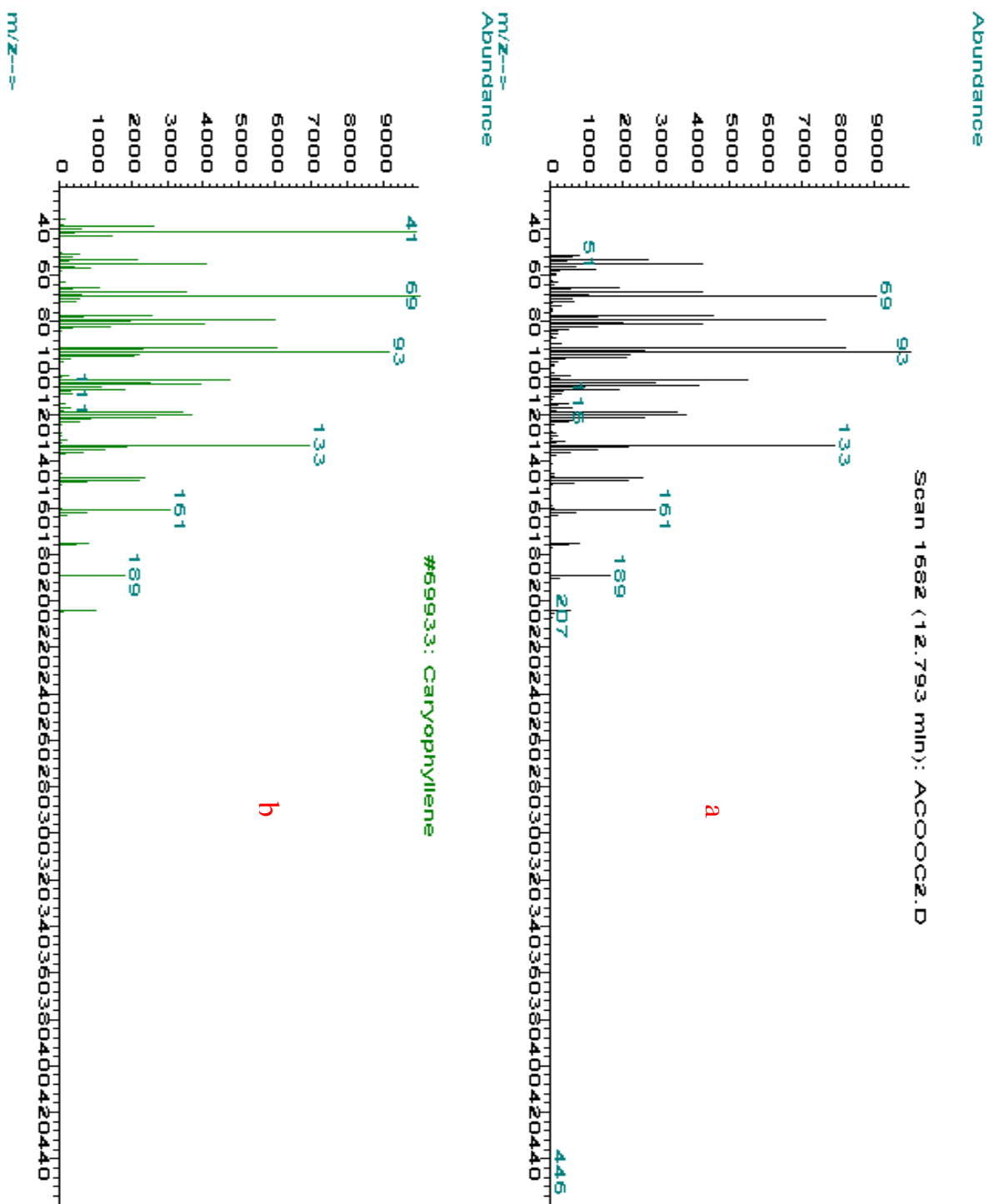
ANEXO C. ESPECTRO DE IR DEL ACEITE ESENCIAL DE *Pinus oocarpa*.



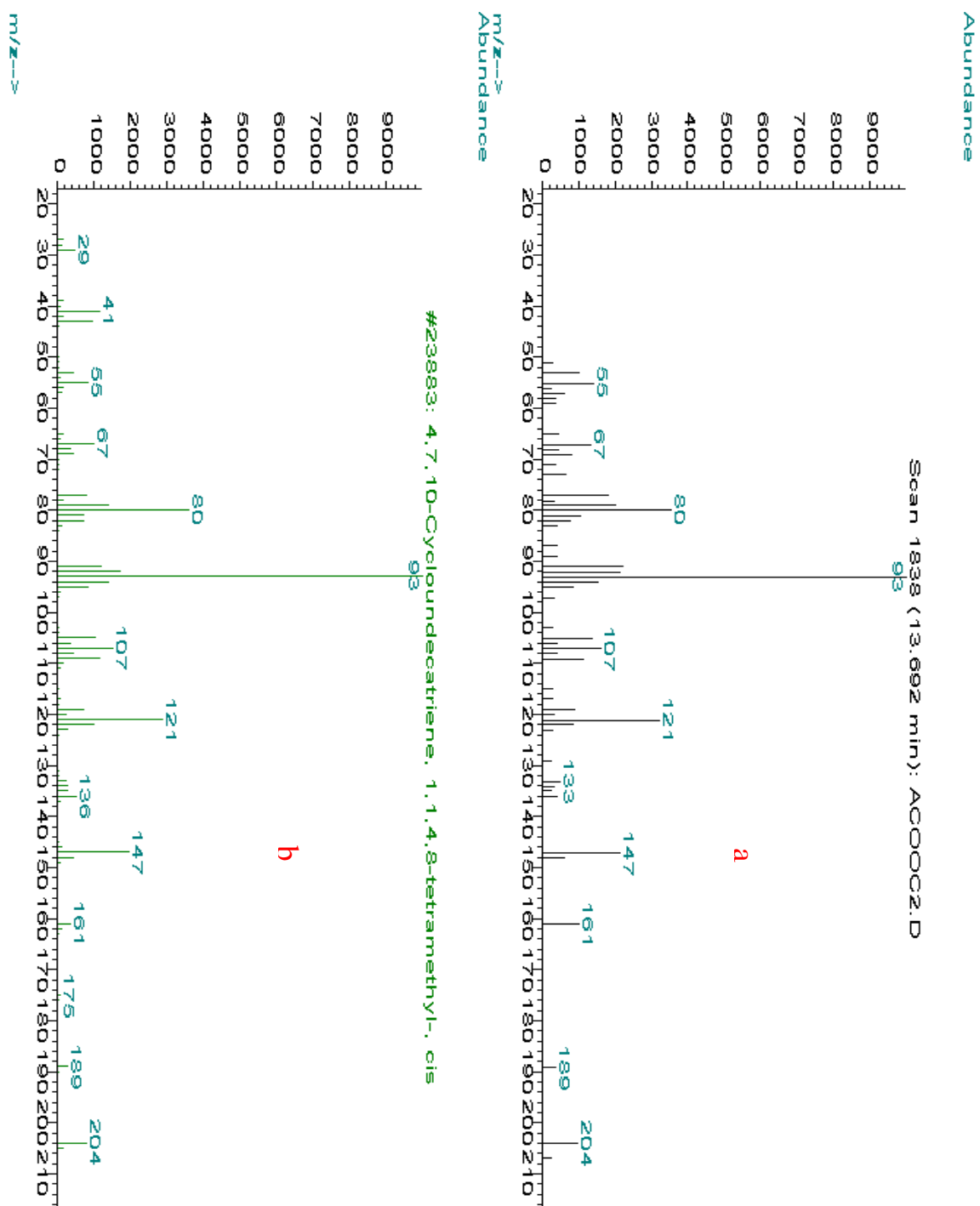
ANEXO D. a) ESPECTRO DE MASAS DE α -PINENO (SEÑAL A 3.26 min.) y a) ESPECTRO QUE PROVEE EL SOFTWARE DEL EQUIPO PARA A-PINENO.



ANEXO E. a) ESPECTRO DE MASAS DE LA SEÑAL A 12.79 min. y b) ESPECTRO QUE PROVEE EL SOFTWARE DEL EQUIPO PARA CARIOFILENO.

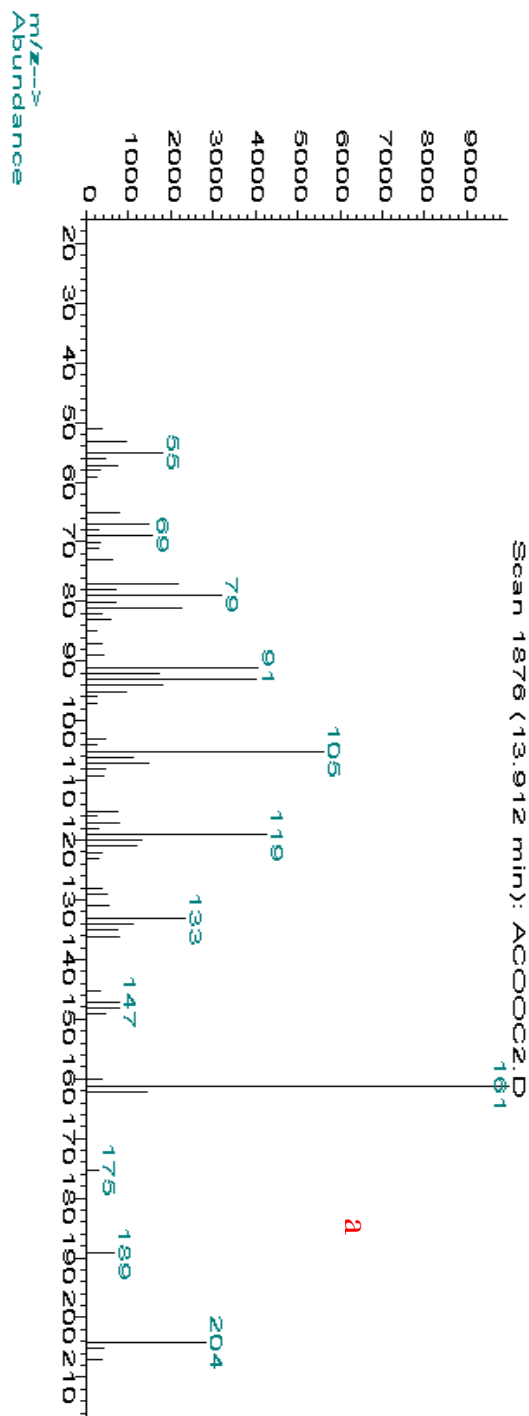


ANEXO F. a) ESPECTRO DE MASAS DE LA SEÑAL A 13.692 min. y b) ESPECTRO QUE PROVEE EL SOFTWARE DEL EQUIPO PARA 1,1,4,8-tetrametil-4,7,10-Cicloundecatrieno.



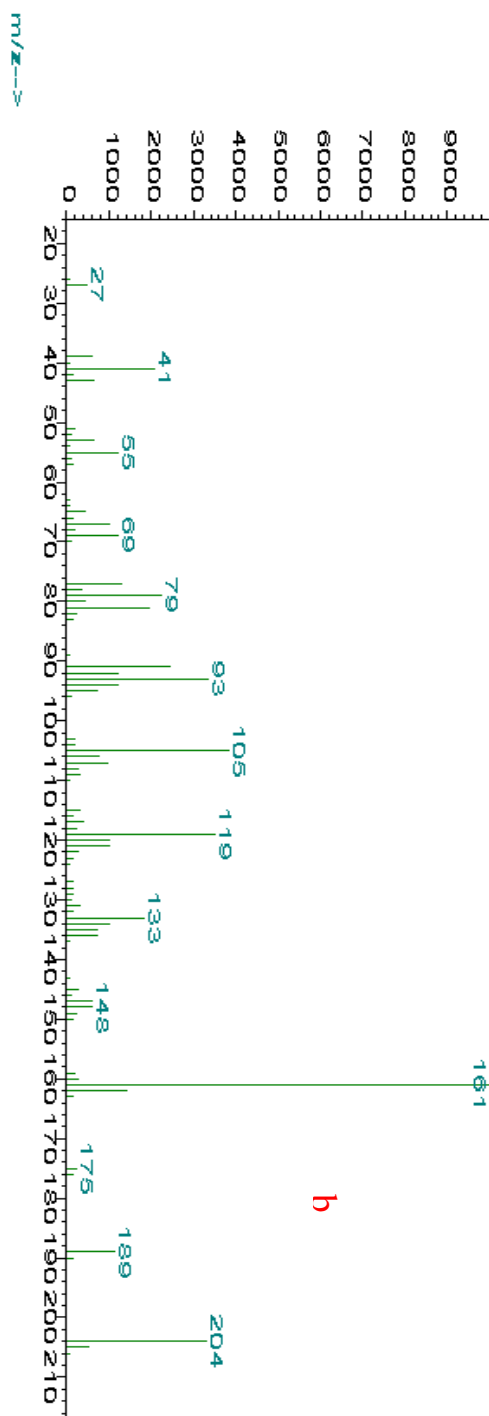
ANEXO G. a) ESPECTRO DE MASAS DE LA SEÑAL A 13.912 min. y b) ESPECTRO QUE PROVEE EL SOFTWARE DEL EQUIPO PARA 7-metil-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahidro-Naftaleno.

Abundance

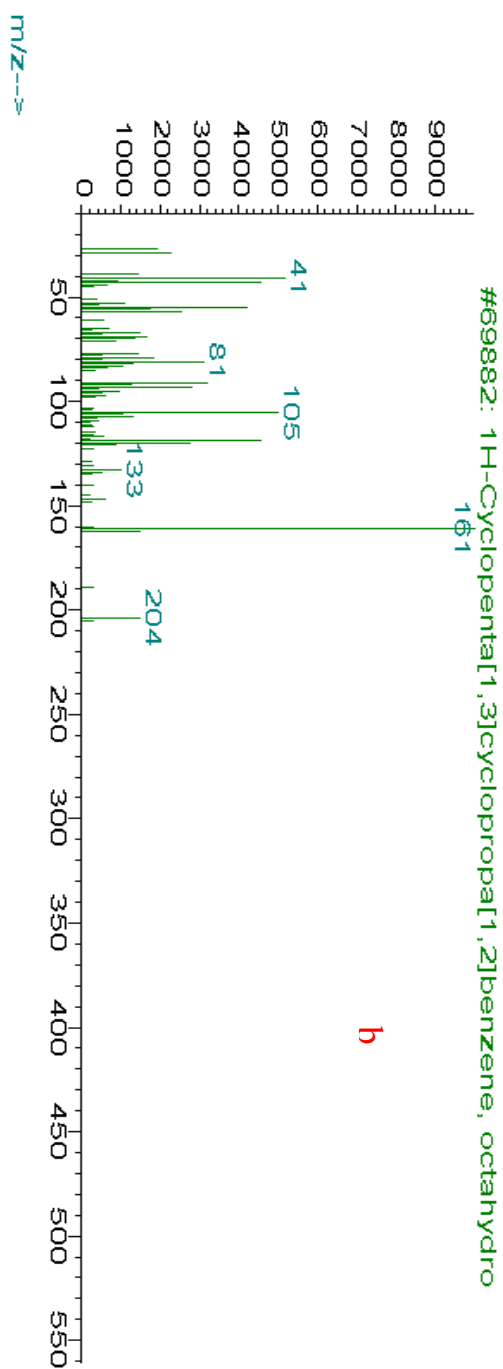
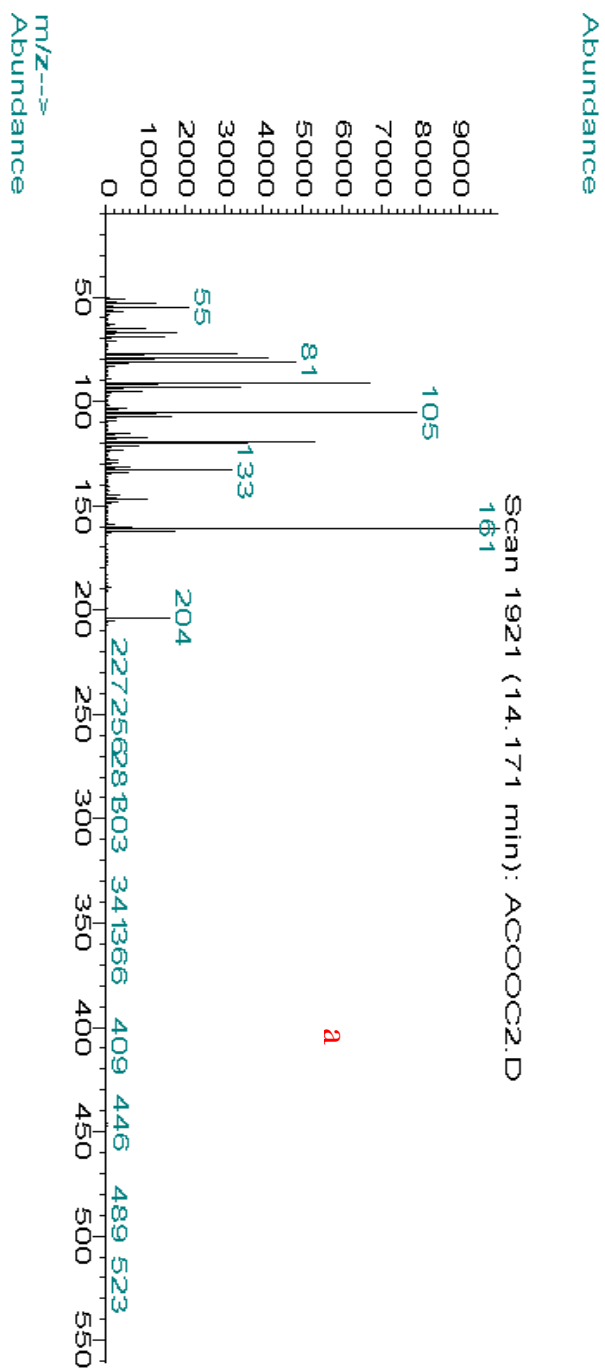


#23933: Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-7-methyl-4

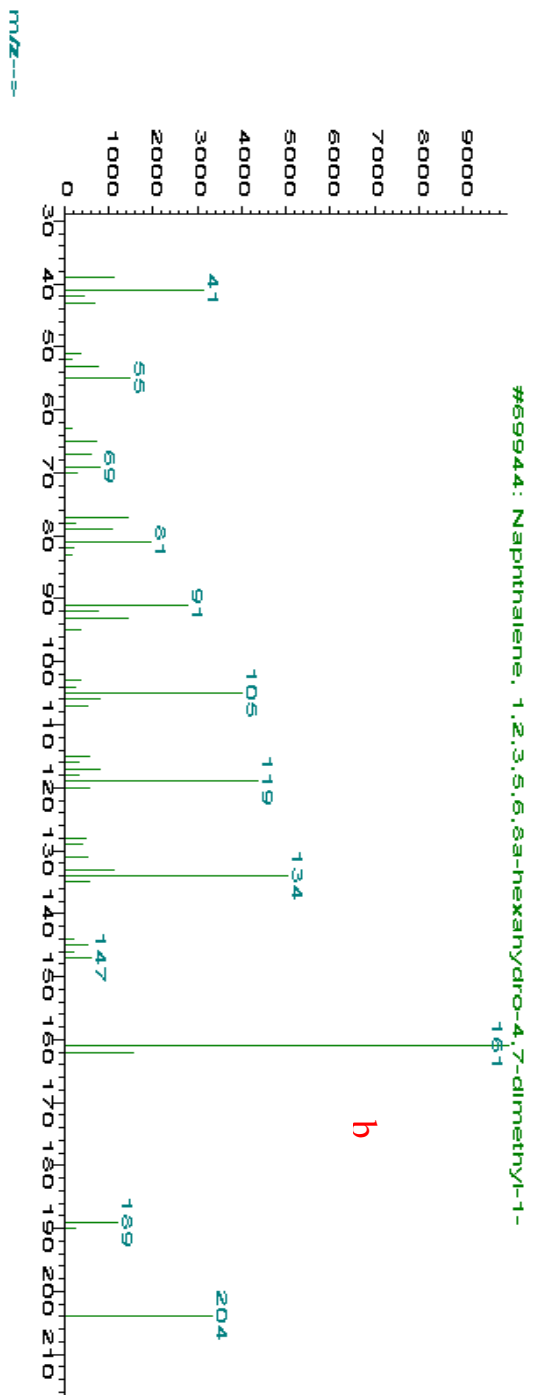
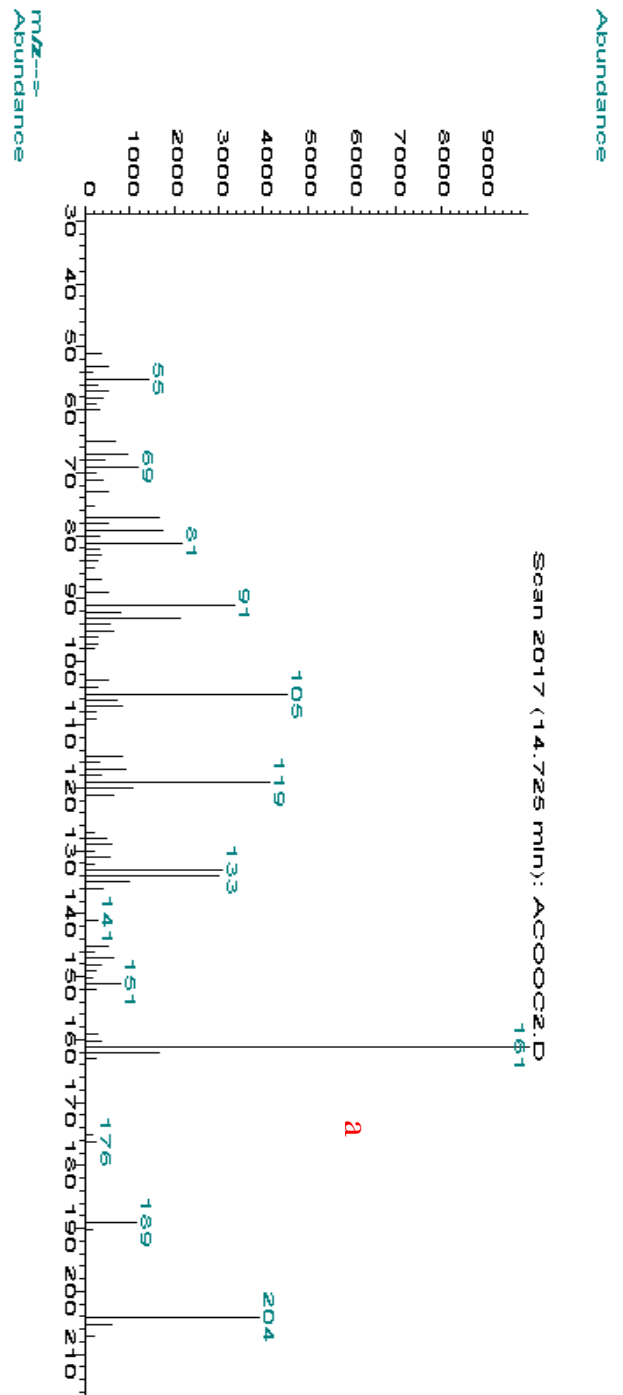
b



ANEXO H. a) ESPECTRO DE MASAS DE LA SEÑAL A 14.171 min. y b) ESPECTRO QUE PROVEE EL SOFTWARE DEL EQUIPO PARA 1H-ciclopenta-1,3-ciclopropa-1,2-benceno.

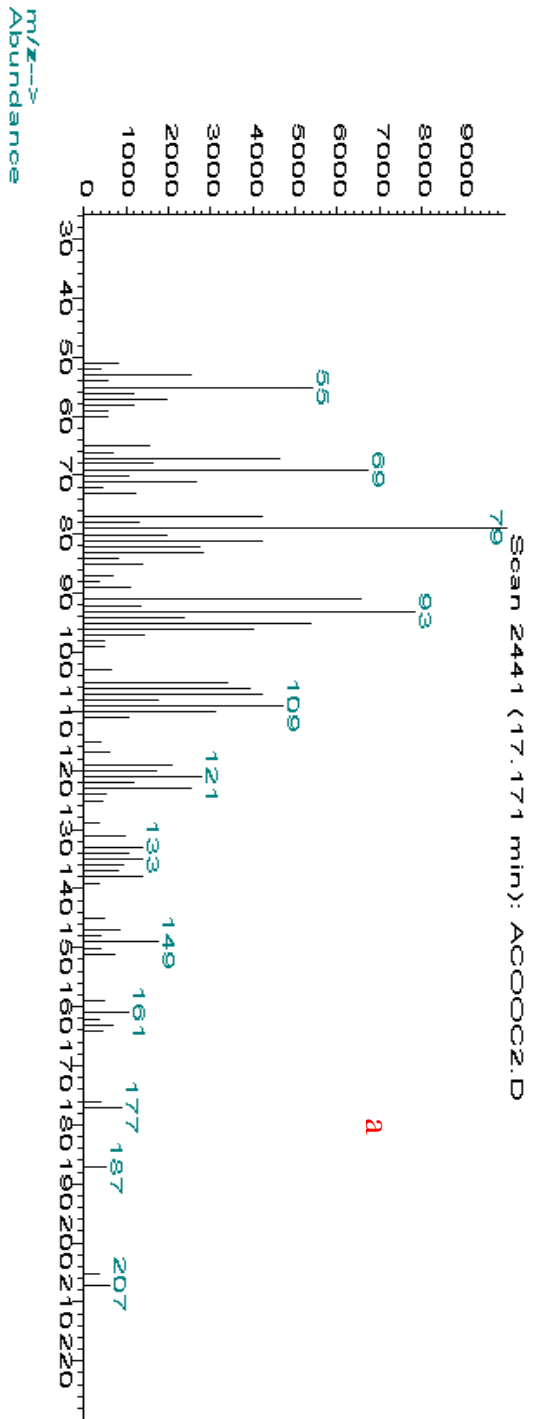


ANEXO I. a) ESPECTRO DE MASAS DE LA SEÑAL A 14.725 min. y b) ESPECTRO QUE PROVEE EL SOFTWARE DEL EQUIPO PARA 1,2,3,5,6,8a-hexahidro-4,7-dimetil-naftaleno.



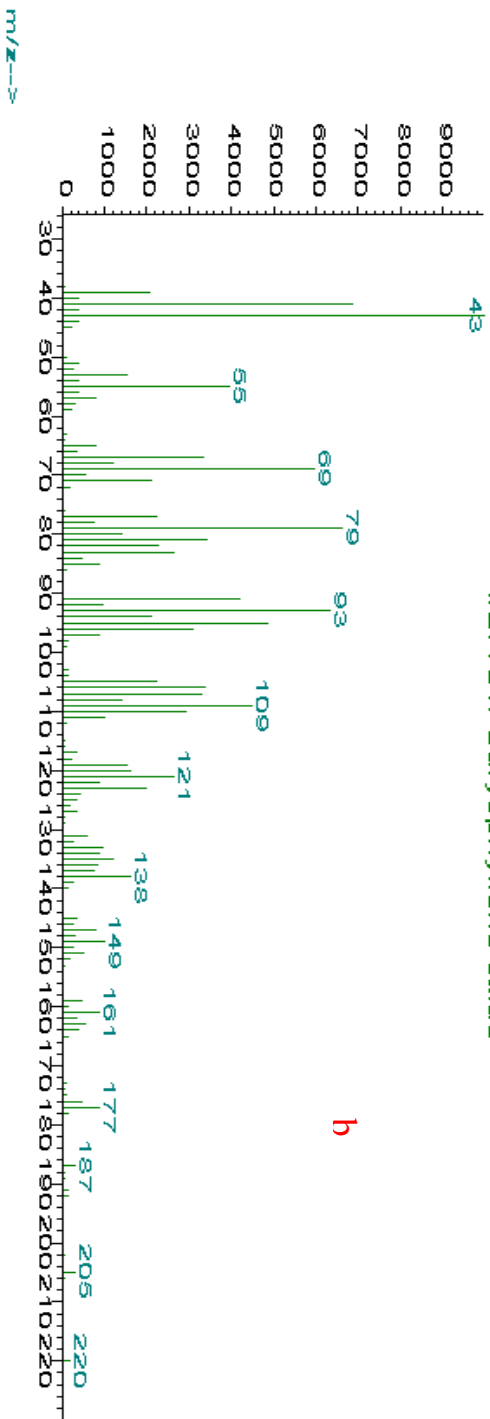
ANEXO J. a) ESPECTRO DE MASAS DE LA SEÑAL A 17.171 min. y b) ESPECTRO QUE PROVEE EL SOFTWARE DEL EQUIPO PARA Oxido de cariofileno.

Abundance



a

#27701: Caryophyllene oxide



b