

**CARACTERIZACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE GASES DEL ACEITE
ESENCIAL DE LA ESPECIE *Eucalyptus grandis***

LILIANA TRÓCHEZ LÓPEZ

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS, Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2007**

**CARACTERIZACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE GASES DEL ACEITE
ESENCIAL DE LA ESPECIE *Eucalyptus grandis***

LILIANA TRÓCHEZ LÓPEZ

Trabajo de investigación para optar al título de Química

Director:

M.Sc. JOSÉ ANTONIO GALLO CORREDOR

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS, Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2007**

Nota de aceptación:

Director: M.Sc. José Antonio Gallo Corredor

Jurado: Ph.D. Fabio Cabezas Fajardo

Jurado: M.Sc. Fernando Hernández Blanco

Fecha de sustentación: Popayán, 10 de Abril de 2007.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue posible gracias a la colaboración de las personas y entidades que se mencionan a continuación, por ello les doy mis más sinceros agradecimientos, ya que, sin su apoyo no se hubiera podido llevar a cabo.

Universidad del Cauca.

Vicerrectoría de Investigaciones.

COLCIENCIAS por la financiación del proyecto.

Cooperativa Agroforestal del Cauca, COOTRAFORC.

Empresa Smurfit Cartón de Colombia

Departamento de Química.

Grupo de Química Analítica Ambiental GIQA.

M.Sc José Antonio Gallo Corredor.

Profesores jurados: Fabio Cabezas Fajardo y Fernando Hernández Blanco

Profesores Departamento de Biología: Bernardo Ramírez y Silvio Carvajal.

Profesores Departamento de Química.

Compañeros y Amigos.

TABLA DE CONTENIDO

		Pág.
	RESUMEN	13
	INTRODUCCIÓN	15
1.0	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
2.0	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GENERAL	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3.0	JUSTIFICACIÓN	20
4.0	MARCO TEÓRICO	21
4.1	ORIGEN, FUNCIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES EN LAS PLANTAS	21
4.1.1	Origen de los aceites esenciales	21
4.1.2	Función de los aceites esenciales en las plantas	22
4.1.3	Localización y distribución de los aceites esenciales en las plantas	22
4.2	COMPOSICIÓN QUÍMICA DE UN ACEITE ESENCIAL	22
4.2.1	Monoterpenos	23
4.2.1.1	Monoterpenos acíclicos	23
4.2.1.2	Monoterpenos monocíclicos	24
4.2.1.3	Monoterpenos bicíclicos	26
4.2.2	Sesquiterpenos	27
4.2.2.1	Sesquiterpenos acíclicos	28
4.2.2.2	Sesquiterpenos monocíclicos	28
4.2.2.3	Sesquiterpenos bicíclicos	28
4.3	MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE ACEITES ESENCIALES	29
4.3.1	Expresión	29
4.3.2	Extracción con solventes volátiles	29
4.3.3	Destilación por arrastre con vapor de agua	29
4.3.4	Extracción con fluidos supercríticos	29
4.3.5	Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas	30
4.4	EUCALIPTO	30
4.4.1	Aceite esencial de eucalipto	31
4.4.2	<i>Eucalyptus grandis</i>	32
4.5	CROMATOGRAFÍA DE GASES	32
4.5.1	Sistema de suministro de gas portador.	33
4.5.2	Sistema de inyección de la muestra.	34
4.5.3	Sistema de termostatación u horno.	34
4.5.4	Columnas.	34
4.5.5	Fases estacionarias.	34
4.5.6	Sistema de detección.	35
4.6	ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE ALGUNOS ACEITES ESENCIALES	36

5.0	METODOLOGÍA	37
5.1	MATERIALES Y EQUIPOS	37
5.2	REACTIVOS	38
5.3	PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DEL FOLLAJE DE <i>Eucalyptus grandis</i>	39
5.3.1	Recolección de la muestra	39
5.3.2	Tratamiento previo de la muestra antes de la extracción	39
5.3.3	Extracción del aceite esencial aplicando el método de destilación por arrastre con vapor de agua	39
5.3.4	Determinación del rendimiento de aceite esencial	39
5.3.4.1	Tiempo de destilación	40
5.3.4.2	Tiempo de recolección	40
5.3.5	Aislamiento y almacenamiento del aceite destilado para los análisis físicos y químicos.	40
5.3.6	Determinación de propiedades físicas y químicas.	40
5.3.6.1	Densidad	40
5.3.6.2	Índice de refracción.	40
5.3.6.3	Punto de volatilización.	40
5.3.6.4	Solubilidad de aceite esencial de eucalipto en solventes orgánicos.	40
5.3.6.5	Índice de acidez libre	41
5.3.7	Análisis espectroscópico del aceite esencial y de los patrones α -pineno, eucaliptol	41
5.3.7.1	Espectro infrarrojo	41
5.3.7.2	Espectro ultravioleta visible	41
5.4	ANÁLISIS DEL ACEITE POR CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECTOR DE IONIZACIÓN EN LLAMA (FID)	41
5.4.1	Optimización de las condiciones cromatográficas para la separación, identificación y cuantificación de dos metabolitos secundarios en el aceite esencial de eucalipto	42
5.4.2	Estandarización del método para determinar eucaliptol y α -pineno en el aceite esencial del follaje de <i>Eucalyptus grandis</i>	42
5.4.2.1	Linealidad	42
5.4.2.2	Sensibilidad	42
5.4.2.3	Precisión	43
5.4.2.4	Exactitud	43
5.4.3	Elección del método de cuantificación	44
6.0	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
6.1	RENDIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL EXTRAÍDO APLICANDO EL MÉTODO DE DESTILACIÓN POR ARRASTRE CON VAPOR	45
6.1.1	Tiempo de destilación	45
6.1.2	Tiempo de recolección	46
6.2	DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES FÍSICAS DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO	47
6.3	ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICOS	48
6.3.1	Análisis por espectroscopía infrarroja	48
6.3.2	Análisis por espectroscopía UV - Visible	51

6.4	ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO PARA DETERMINAR EUCALIPTOL Y α -PINENO EN EL ACEITE ESENCIAL DEL FOLLAJE DE <i>Eucalyptus grandis</i>	52
6.4.1	Estandarización del método analítico	52
6.4.1.1	Optimización de las condiciones cromatográficas	52
6.4.1.2	Curva Van Deemter para determinación del flujo óptimo en la columna HP-INNOWAX	52
6.4.1.3	Método de cuantificación	53
6.4.1.4	Condiciones instrumentales para el análisis de los metabolitos secundarios α -pineno y eucaliptol en el aceite esencial de eucalipto	56
6.5	DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO	57
6.5.1	Linealidad	59
6.5.2	Sensibilidad	59
6.5.2.1	Limite de cuantificación y limite de detección	59
6.5.3	Precisión	60
6.5.3.1	Repetitividad	60
6.5.3.2	Reproducibilidad	62
6.5.4	Exactitud	62
6.5.5	Cuantificación de α - pineno y eucaliptol en las muestras de aceite esencial de eucalipto	64
7.0	CONCLUSIONES	67
	RECOMENDACIONES	69
	BIBLIOGRAFÍA	70
	ANEXOS	74

LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla No 1	Reactivos para análisis del aceite esencial de eucalipto	37
Tabla No 2	Materiales y equipos para análisis del aceite esencial de eucalipto	38
Tabla No 3	Datos de rendimiento de aceite esencial de eucalipto según tiempo de destilación	45
Tabla No 4	Rendimiento del aceite esencial de acuerdo al tiempo de recolección del follaje de <i>Eucalyptus grandis</i>	46
Tabla No 5	Propiedades físicas y químicas del aceite esencial de eucalipto	47
Tabla No 6	Solubilidad de aceite esencial de eucalipto en solventes orgánicos	48
Tabla No 7	Información Espectro I.R del Aceite de Eucalipto	49
Tabla No 8	Información Espectro I.R de Eucaliptol.	50
Tabla No 9	Información Espectro I.R de α - pineno.	51
Tabla No 10	Parámetros instrumentales para análisis de α -pineno y eucaliptol en el aceite esencial de eucalipto.	56
Tabla No 11	Límite de detección y límite de cuantificación de α -pineno	60
Tabla No 12	Límite de detección y límite de cuantificación de eucaliptol	60
Tabla No 13	Datos de las áreas y sus respectivas desviaciones estándar de la curva de calibración de α -pineno en el rango de concentraciones de 3 – 13 ppm	61
Tabla No 14	Datos de las áreas y sus respectivas desviaciones estándar de la curva de calibración de α -pineno en el rango de concentraciones de 13 – 60 ppm.	61

Tabla No 15	Datos de las áreas y sus respectivas desviaciones estándar de la curva de calibración de eucaliptol en el rango de concentraciones de 3 – 13 ppm.	62
Tabla No 16	Datos para la evaluación de reproducibilidad de la curva de calibración de α -pineno de 13 a 60 ppm	62
Tabla No 17	Datos para la evaluación de reproducibilidad de la curva de calibración de eucaliptol de 3 a 13 ppm.	62
Tabla No 18	Datos para determinar el t student y calcular el porcentaje de recuperación de estándares de α - pineno en la curva de calibración (13-60 ppm).	63
Tabla No 19	Datos para determinar el t student y calcular el porcentaje de recuperación de estándares de eucaliptol en la curva de calibración (3-13 ppm)	64
Tabla No 20	Concentración de α - pineno en la muestra de aceite esencial de eucalipto de acuerdo con el tiempo de recolectada la muestra.	65
Tabla No 21	Concentración de eucaliptol en la muestra de aceite esencial de eucalipto de acuerdo con el tiempo de recolectada la muestra.	66

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Curva de Van Deemter para determinar el flujo óptimo en la columna HP-INNOWAX (25m x 0.20mm x 0.20 μ m)	53
Figura 2	Cromatograma de los patrones α -pineno, eucaliptol y α -terpineol disueltos en etanol.	54
Figura 3	Cromatograma de la muestra de aceite esencial de eucalipto disuelta en etanol (100 ppm)	55
Figura 4	Cromatograma de aceite esencial de eucalipto disuelto en etanol (200 ppm)	55
Figura 5	Cromatograma de los estándares alfa-pineno, eucaliptol y citronelol.	56
Figura 6	Cromatograma de los estándares α -pineno y eucaliptol disueltos en etanol en las condiciones en las que se hará el análisis	57
Figura 7	Cromatograma de la muestra de aceite esencial de eucalipto en las condiciones en las que se hará el análisis	57
Figura 8	Curva de calibración de α -pineno en el rango de concentraciones de 3 hasta 13 ppm	58
Figura 9	Curva de calibración de α -pineno en el rango de concentraciones de 13 hasta 60 ppm	58
Figura 10	Curva de calibración de α -pineno en el rango de concentraciones de 3 hasta 13 ppm	59

LISTA DE ANEXOS

		Pág.
ANEXO A.	Espectro Infrarrojo del aceite esencial de <i>Eucalyptus grandis</i>	75
ANEXO B.	Espectro Infrarrojo del estándar alfa-pineno	76
ANEXO C.	Espectro Infrarrojo del estándar eucaliptol	77
ANEXO D.	Espectro UV del aceite esencial de <i>Eucalyptus grandis</i>	78
ANEXO E.	Espectro UV del estándar alfa-pineno	79
ANEXO F.	Espectro UV del estándar eucaliptol	80
ANEXO G.	Constacia de herbario de la especie <i>Eucalyptus grandis</i>	81

LISTA DE ABREVIATURAS

G.C	Cromatografía de Gases
GC/MS	Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas
G.C/FID	Cromatografía de Gases con Detector de Ionización de Llama
G.I.Q.A.	Grupo de Investigación en Química Analítica Ambiental
P.F.N.M.	Productos Forestales No Maderables
T.C.D.	Detector de Conductividad Térmica
F.I.D.	Detector de Ionización de Llama
COOTRAFORD	Cooperativa Agroforestal del Cauca
H.P.L.C.	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
D.I.	Diámetro Interno
µm	Micrómetro
E.M	Espectrometría de Masas
I.K	Índice de Retención de Kovats
µL	Microlitros
m	Metros
mm	Milímetros
min	Minutos
RSD	Desviación Estándar Relativa
S	Desviación Estándar
I.R.	Infrarrojo

RESUMEN

La actividad forestal realizada por empresas dedicadas a la industria maderera que buscan producir materia prima destinada a la obtención de pulpa para la fabricación de papel, cartón y materia prima para la construcción, genera abundante material de desecho, como corteza y follaje, principalmente de las especies pino y eucalipto. El follaje, es un tipo de biomasa que se acumula en grandes cantidades en los bosques debido a que después de la operación de corte es retirado de los árboles y dejado en el suelo como desecho.

El *Eucalyptus grandis*, es una de las especies ampliamente cultivadas en el departamento del Cauca donde existen aproximadamente 14000 hectáreas de bosques sembrados con coníferas y mirtáceas¹.

El aceite esencial de *Eucalyptus grandis* fue extraído por el método de destilación por arrastre con vapor, posteriormente se le realizaron pruebas físicas y químicas como densidad, solubilidad, índice de refracción, punto de ebullición y ácidos libres con el fin de obtener una indicación de su pureza y calidad. Además se le hizo caracterización por espectroscopía de infrarrojo y comprobación por ultravioleta visible.

También se estandarizó una metodología para determinar los componentes eucaliptol y α -pineno en el aceite esencial del follaje de la especie *Eucalyptus grandis*, la cual se realizó utilizando la técnica de cromatografía de gases con detector de ionización en llama (GC-FID).

La extracción del aceite esencial del follaje de *Eucalyptus grandis* es una forma de aprovechamiento parcial de este residuo, a la vez que se contribuye a darle una utilización económica integral a un recurso natural renovable y abundante como es el bosque forestal. Además sectores como la química fina buscan nuevas materias primas como los aceites esenciales que constituyen una fuente inagotable de nuevas moléculas derivatizables por síntesis química o bioquímica para obtener nuevos productos de aplicación tanto en las industrias cosmética, perfumera, alimentaria y farmacéutica².

Al identificar y cuantificar alfa pineno y eucaliptol en el aceite esencial de eucalipto se hará un aprovechamiento de recursos naturales asociados a nuestra biodiversidad a través del añadido de valor agregado que se dará al follaje. Por ello es un aspecto fundamental el conocimiento de la existencia de éstos dos componentes en el follaje de *Eucalyptus grandis*.

La importancia de determinar el porcentaje de eucaliptol y alfa pineno en el aceite esencial del follaje de *Eucalyptus grandis* se debe a que en estudios del aceite esencial de eucalipto se ha reportado que tiene notables propiedades

antisépticas por su componente activo el eucaliptol y puede ser usado en la preparación de medicinas^{3, 4}. También a que recientemente se ha encontrado que los aceites esenciales de eucalipto producen cantidades importantes de alfa pineno, hecho que ha motivado el estudio de la reactividad de éste compuesto y su transformación en canfeno, un hidrocarburo bicíclico cristalino que se utiliza en la síntesis de productos farmacéuticos como el alcanfor y también en las fragancias de pino, lavanda, cedro y cítricos⁵.

INTRODUCCIÓN

El mundo de las plantas, y en particular los bosques tropicales, abarca una amplia gama de compuestos químicos, la mayoría de ellos desconocidos y poco estudiados. Durante muchos siglos las personas de todo el mundo, han rastreado el reino vegetal en busca de medicamentos; en algunas tradiciones lo han venido haciendo por más de un milenio. De hecho, han realizado un “prerastreo” empírico de sus floras locales para encontrar sustancias vegetales bioactivas, y el acercamiento etnofarmacológico se aprovecha de este conocimiento para descubrir medicamentos.

Los compuestos vegetales secundarios a los cuales pertenecen los aceites esenciales no están directamente involucrados en los procesos metabólicos básicos de las plantas. En muchos casos los compuestos secundarios pueden servir para defender a la planta contra los herbívoros y patógenos. Una gran cantidad de ellos son biológicamente activos en muchos organismos, incluyendo al ser humano. Las sociedades humanas han sido capaces de entender, controlar, y aprovechar estas actividades para mejorar su salud ⁶.

Los bosques forestales son fuente de diversos productos además de la madera que, pueden ser aprovechados para otros fines, es el caso de los denominados productos forestales no maderables, entre ellos los aceites esenciales que actualmente son muy valiosos por sus múltiples aplicaciones, en perfumería, cosmetología y en la industria farmacéutica.

En Colombia hay aproximadamente 141.000 hectáreas cultivadas, con coníferas (*Pinus*) y mirtáceas (*Eucalyptus*), destinadas comercialmente a la producción de la madera, desechando los residuos de esta actividad como son: la corteza y el follaje ¹. Con este trabajo se propone el aprovechamiento parcial del follaje para la obtención de aceites esenciales, puesto que estos han presentado un crecimiento sostenido en la demanda del mercado internacional, ya que juegan un papel importante como ingredientes insustituibles, y determinantes en las industrias de alimentos, cosméticos, farmacéuticos, insecticidas, jabones y perfumes.

Las especies de *Eucalyptus* son árboles de crecimiento rápido explotados principalmente para la producción de madera y pulpa para la fabricación de papel y cartón, pero su follaje como antes se mencionó sirve como una fuente para la extracción de aceites esenciales. En la producción de fitofarmacéuticos, los aceites esenciales ricos en 1,8-cineol (llamado también “eucaliptol”) y alfa pineno, son de importancia especial. Estos productos son aplicados para el alivio de principalmente resfriados, reumatismo, dolor muscular, y como expectorante en casos de bronquitis (adicionado a jarabes para la tos). Existen 20 o más especies de *Eucalyptus* usados para la producción de este tipo de aceite ^{3,4}.

En la actualidad, los métodos cromatográficos de gases han sido ampliamente aplicados para la determinación de componentes individuales en aceites esenciales. Estos métodos ofrecen alta sensibilidad para compuestos orgánicos volátiles, así como rapidez y eficacia en la resolución e identificación ⁷.

En el presente trabajo se identificará y cuantificará dos componentes en el aceite esencial del follaje de *Eucalyptus grandis*, una especie forestal cultivada en el departamento del Cauca, utilizando la técnica de cromatografía de gases con detector de ionización de llama.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La biomasa se refiere a aquel grupo de productos energéticos, materias primas, materia orgánica, residuos, todos ellos de carácter renovable, que han tenido su origen inmediato como consecuencia de un proceso biológico o de fotosíntesis y que son susceptibles de ser transformados por medios biológicos o térmicos para generar energía.

Las fuentes de biomasa en general son todo tipo de residuos producidos por actividades forestales, agrícolas y pecuarias⁸. En nuestro caso los residuos forestales, especialmente el follaje de *Eucalyptus grandis* se pretende utilizar como fuente para la obtención de aceites esenciales. Estos productos son de gran valor para la economía del país debido a sus múltiples aplicaciones, al extraerlos a partir del follaje se consigue una ganancia económica y al mismo tiempo ambiental puesto que se evita la acumulación incontrolada de altos volúmenes de follaje que podrían tener un impacto negativo sobre el ecosistema y causar graves problemas de contaminación¹.

En la industria de la madera durante la operación de corte se generan grandes cantidades de follaje, que actualmente no están siendo utilizados. Esta biomasa podría ser empleada como materia prima para la extracción de aceites esenciales. En el departamento del Cauca existen más de 14000 hectáreas de bosques cultivados con coníferas y mirtáceas, ubicadas en los municipios de Popayán, Cajibío, Sotará y Timbío. El *Eucalyptus grandis* es una de éstas especies¹.

Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas de compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos) e hidrocarburos alicíclicos del grupo de los terpenos, son un producto del metabolismo secundario de las plantas cuya composición varía dependiendo de las condiciones geobotánicas y agrícolas de su cultivo². Su valor económico y su aplicabilidad industrial están relacionados directamente con su composición química. Es por ello que se pretende con este proyecto el estudio del aceite esencial obtenido a partir del follaje de la planta *Eucalyptus grandis*, mediante el cual se buscará establecer químicamente la presencia de los metabolitos secundarios eucaliptol y α -pineno dado que éstas sustancias en especial el primero, es el principal componente del aceite de eucalipto clasificado como de tipo medicinal y que tiene una alta demanda en el mercado internacional.

Para esta investigación se estandarizará un método analítico para la identificación y cuantificación de los compuestos terpénicos eucaliptol y α -pineno en el aceite esencial de *Eucalyptus grandis*, utilizando la técnica analítica de cromatografía de gases (GC), con detector de ionización en llama (FID).

Para el presente estudio se tiene ejemplar de herbario en proceso de identificación, de la especie *Eucalyptus grandis*, con código de referencia 01, en el herbario de La Universidad del Cauca.

El conocimiento que se adquiriera con éste estudio ayudará a darle un valor agregado al follaje obtenido como residuo de la actividad forestal, en tanto que generará empleo constante puesto que, se requerirá personal que se ocupe de la recolección, almacenamiento y procesamiento de esta materia prima.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Estandarizar una metodología para la identificación y cuantificación de los metabolitos secundarios, eucaliptol y α -pineno en el aceite esencial obtenido del follaje de la planta de *Eucalyptus grandis* utilizando como técnica analítica Cromatografía de Gases con Detector de Ionización en Llama (GC-FID).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1 Obtener el aceite esencial a partir del follaje de la especie *Eucalyptus grandis* empleando el método de destilación por arrastre con vapor.
- 2.2.2 Determinar la calidad del aceite esencial de *Eucalyptus grandis* mediante pruebas físicas y químicas.
- 2.2.3 Encontrar las condiciones cromatográficas óptimas, que permitan una eficiente separación e identificación de los metabolitos secundarios α -pineno y eucaliptol.
- 2.2.4 Cuantificar los componentes α -pineno y eucaliptol en la muestra de aceite esencial, empleando el método de estándar externo (curva de calibración).
- 2.2.5 Validar la confiabilidad de los datos obtenidos en la cuantificación con ayuda del tratamiento estadístico.

3. JUSTIFICACIÓN

El mercado de los aceites esenciales es bastante dinámico, competitivo y en continua transformación para adaptarse a las exigencias del consumidor. La consolidación de una industria de aceites esenciales capaz de satisfacer los mercados nacional e internacional con productos de calidad garantizada y valor agregado alto requiere de la capacitación y formación de recursos humanos, que la respalden científicamente en áreas como extracción de esencias, análisis y control de calidad, además de asesoría técnica en el cultivo, recolección de materia prima, almacenamiento, tratamiento y control de calidad. El valor económico y la aplicabilidad industrial de las esencias están directamente relacionados con su composición química. Es por ello que el establecimiento de la composición del aceite esencial es una tarea importante y requiere de la combinación de diferentes métodos de extracción de los metabolitos secundarios volátiles de la planta y de su análisis exhaustivo, usando técnicas de separación, detección e identificación, sensibles y específicas tales como la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS)².

En el departamento del Cauca existen extensas plantaciones de especies forestales de pino y eucalipto pertenecientes a la empresa Smurfit Cartón de Colombia, las cuales son utilizadas para obtener madera que es la materia prima para la producción de papel. Una vez se obtiene la madera quedan en los bosques ciertos subproductos como follaje y corteza. Estos constituyen una gran cantidad de biomasa que se está desperdiciando, por ello es importante aprovechar al máximo dichos residuos con el fin de obtener los llamados Productos Forestales No Maderables (PFNM) como son los aceites esenciales y la resina de pino entre otros.

Los aceites esenciales constituyen el producto forestal no maderable que mayor aporte económico puede brindar, teniendo en cuenta sus múltiples aplicaciones en perfumería, en la producción de cosméticos, y en medicina; aparte del gran valor que han alcanzado internacionalmente, especialmente los provenientes del follaje verde de especies forestales.

Particularmente los bosques de la especie *Eucalyptus grandis* generan suficiente follaje, del cual se podría extraer su aceite esencial, el cual como es sabido posee valiosas propiedades terapéuticas, insecticidas, fungicidas, lo cual favorece su producción industrial^{3, 9}, así como la determinación de su composición química. Además el conocimiento adquirido en el presente estudio es fundamental para valorar al *Eucalyptus grandis* como una especie promisoría en la obtención de su esencia que puede satisfacer los mercados nacional e internacional, que en la actualidad prefieren los aceites esenciales naturales puesto que ofrecen seguridad para ser utilizados como principios activos, saborizantes y antioxidantes².

4. MARCO TEÓRICO

Los componentes volátiles provenientes de plantas han atraído la atención del hombre desde la antigüedad como principios aromáticos o especies de gran complejidad en su composición. El estudio de los aceites esenciales como materias primas básicas para la industria de fragancias, sabores y cosméticos se ha transformado en una de las áreas de investigación y desarrollo más importantes para muchos países. Inicialmente considerados como material de deshecho del metabolismo de las plantas, la importancia biológica de los aceites esenciales ha sido reconocida sólo recientemente ¹¹.

Los aceites esenciales son mezclas de compuestos orgánicos volátiles productos del metabolismo secundario de las plantas, que se aíslan mediante algún proceso físico de una sola especie botánica odorífera, se hallan concentrados en forma de minúsculas gotas localizados en un determinado órgano vegetal, como hojas, flores, frutos, tallos, semillas y hasta raíces o en toda la planta¹¹. Se han identificado más de 3000 aceites de un vasto número de especies vegetales y se han comercializado varios cientos. Se emplean para la elaboración de saborizantes, aromatizantes, licores, perfumes, artículos de aseo y como materias primas para productos farmacéuticos y en la síntesis orgánica fina ².

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas. En su gran mayoría son de olor agradable, aunque existen algunos de olor relativamente desagradable como por ejemplo los del ajo y la cebolla, los cuales contienen compuestos azufrados¹².

4.1 ORIGÉN, FUNCIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES EN LAS PLANTAS

4.1.1 Origen de los aceites esenciales. Los aceites esenciales están constituidos por una variedad de compuestos pertenecientes a todas las clases químicas. No es posible encontrar una historia común para tal variedad de sustancias, sin embargo se ha observado cierta relación química en un grupo de componentes. Esta semejanza según la investigación química esta dada en términos de cuatro grupos, tales como hidrocarburos de cadena recta, derivados bencénicos, terpenos y compuestos diversos.

En vista de su semejanza estructural los hidrocarburos de cadena recta se considera están conectados generalmente con el metabolismo de ácidos grasos. Este grupo incluye los terpenos.

Se ha encontrado que los miembros de ésta serie se dividen en cadenas ramificadas de cinco átomos de carbono estructura que actualmente representa la unidad básica en la formación de los terpenos en las plantas.

La unidad básica precursora de los terpenos es el isopreno (C_5H_8), perteneciente al grupo de los hemiterpenos, a partir del isopreno se derivan los isoprenoides por la unión “cabeza - cola” de dos moléculas de isopreno (monoterpenos), tres (sesquiterpenos), cuatro (diterpenos), etcétera ¹³.

4.1.2 Función de los aceites esenciales en las plantas. En la planta los aceites esenciales cumplen una labor de gran importancia. Se dice que estos compuestos han sido creados en el laboratorio químico de la naturaleza para proteger y prolongar la vida de las plantas, ya que a menudo constituyen un medio de defensa frente a depredadores, actuando como repelentes de insectos, microorganismos, hongos y animales herbívoros, previniendo así la destrucción de las flores y hojas; otras veces, las esencias de las flores y del polen actúan como hormonas de polinización, atrayendo a las abejas y a otros insectos, con lo cual ayudan en la fertilización cruzada de ciertas plantas¹⁴.

4.1.3 Localización y distribución de los aceites esenciales en las plantas. Los aceites esenciales se encuentran ampliamente distribuidos en unas 60 familias de plantas, algunas de las más importantes son: Labiadas, compuestas, Mirtáceas, Pináceas, Rosáceas, Umbelíferas, etc. Se les puede encontrar en diferentes partes de la planta: en las hojas (albahaca, cidrón, eucalipto, menta, salvia, etc.), en las raíces (angélica, cúrcuma, etc.), en el pericarpio del fruto (limón, mandarina, naranja, etc.), en las semillas (anís, cardamomo, etc.), en el tallo (canela, caparrapí, etc.), en las flores (lavanda, manzanilla, tomillo, clavo de olor, rosa, etc.) y en los frutos (cilantro, laurel, pimienta, etc.)¹².

4.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE UN ACEITE ESENCIAL

En los aceites esenciales encontramos mezclas complejas volátiles cuya composición es de terpenos, sesquiterpenos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos y ésteres; junto con otros restos no volátiles constituidos por alcanfores y materiales céreos.

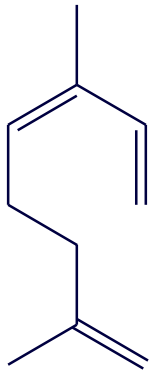
Las sustancias que predominan en los aceites esenciales pertenecen a los terpenos, una familia muy diversa de compuestos en los que se halla la unidad fundamental isopreno (C_5H_8).

Los mayores componentes de los aceites esenciales son los monoterpenos con fórmula general ($C_{10}H_{16}$) y sesquiterpenos con fórmula general ($C_{15}H_{24}$)¹⁵.

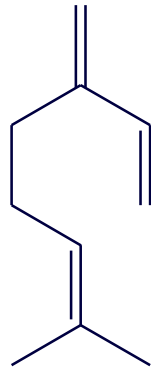
A continuación se presentan algunas estructuras de monoterpenos y sesquiterpenos:

4.2.1 Monoterpenos. Los monoterpenos se subdividen en tres grupos: acíclicos, monocíclicos y bicíclicos.

4.2.1.1 Monoterpenos acíclicos. Entre los hidrocarburos importantes están ocimeno y mirceno

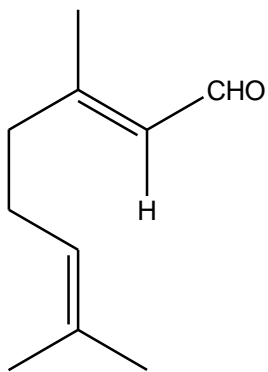


Ocimeno

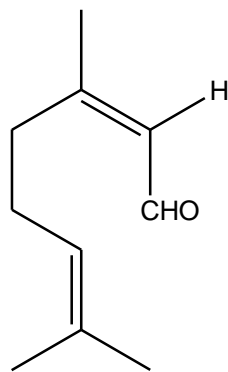


Mirceno

Aldehidos

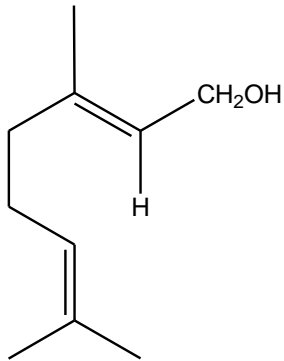


Geranial

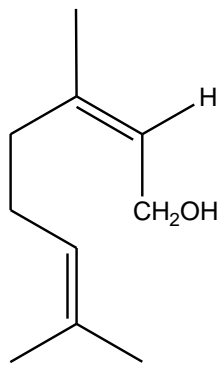


Neral

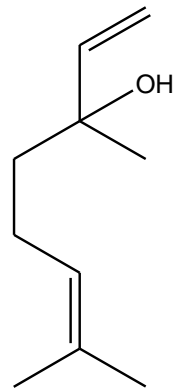
Alcoholes



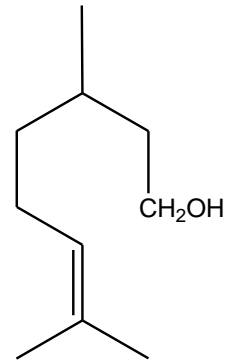
Geraniol



Nerol

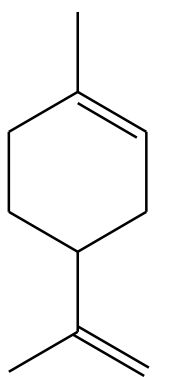


Linalol

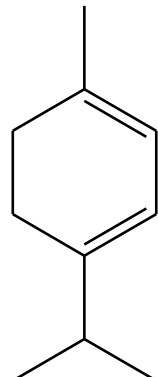


Citronelol

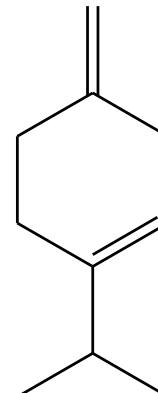
4.2.1.2 Monoterpenos monocíclicos. Los hidrocarburos importantes son:



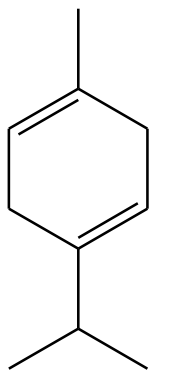
d-Limoneno



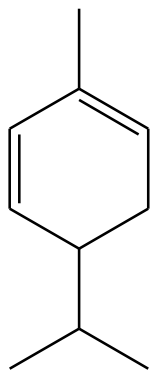
α -Terpineno



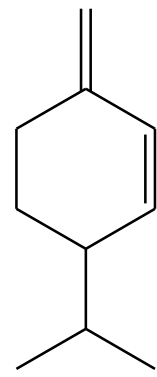
β -Terpineno



γ -Terpineno

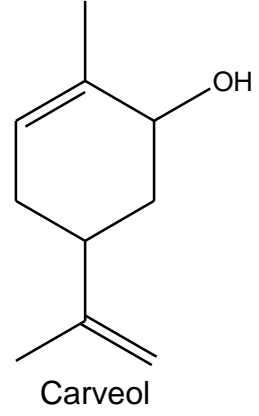
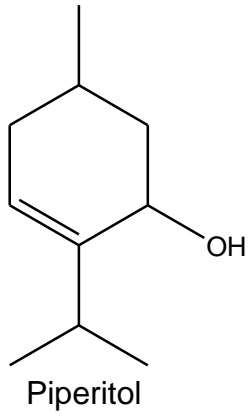
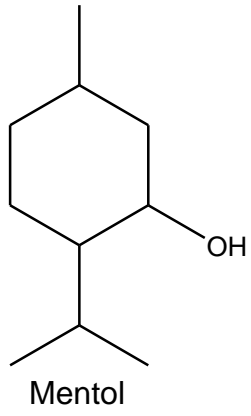
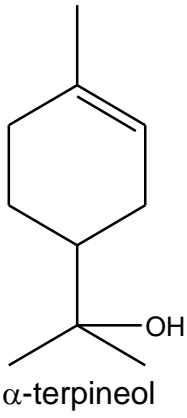


α -Felaldreno

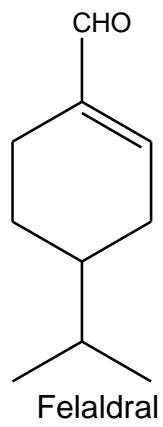
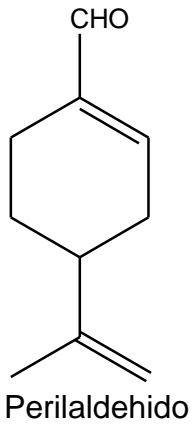


β -Felaldreno

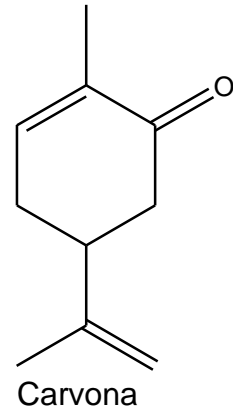
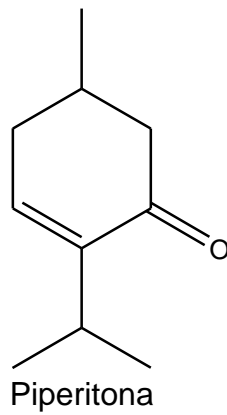
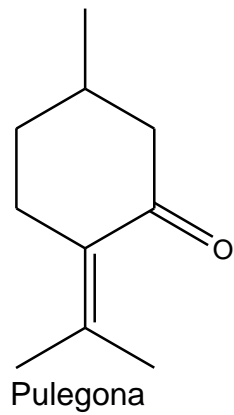
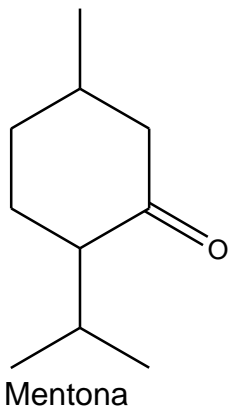
Alcoholes



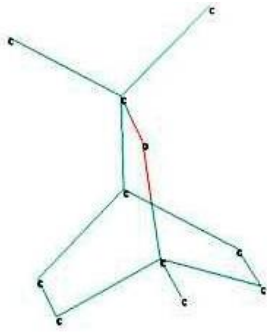
Aldehidos



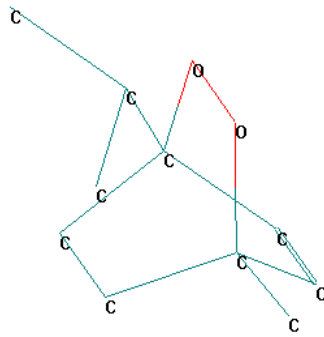
Cetonas



Óxidos



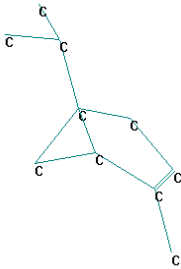
1,8-Cineol (eucaliptol)



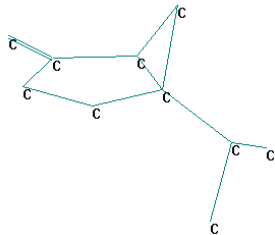
Ascaridol

4.2.1.3 Monoterpenos bicíclicos. Los monoterpenos bicíclicos pueden dividirse en cinco grupos.

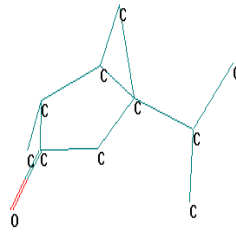
Grupo Tuyeno



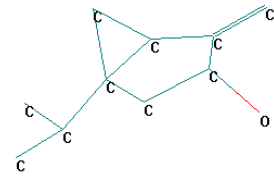
α -Tuyeno



Sabineno

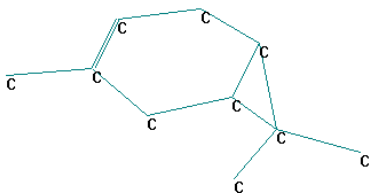


Thuyona

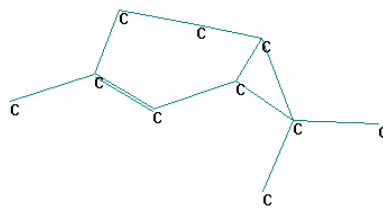


Sabinol

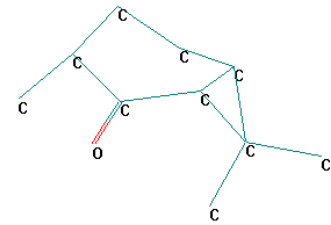
Grupo Careno



Car-3-eno



Car-4-eno

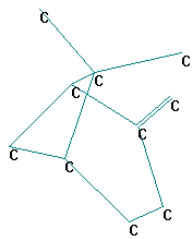


Carona

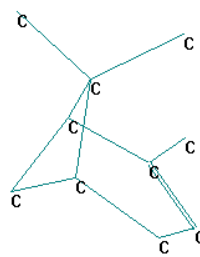
Grupo Pineno



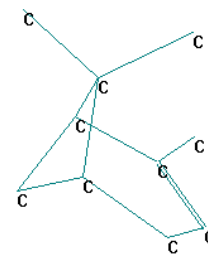
α -Pineno



β -Pineno

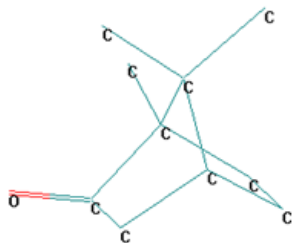


Mircenal

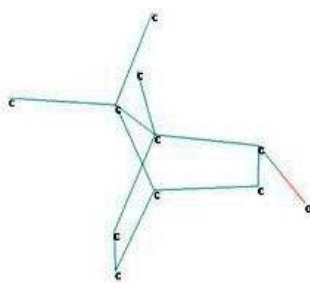


Mircenol

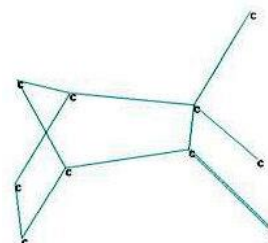
Grupo Canfeno



Canfor

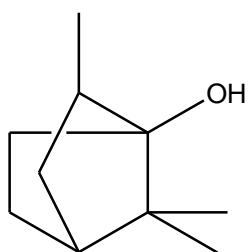


Borneol

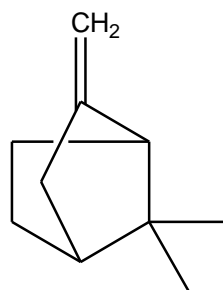


Canfeno

Grupo Fenqueno



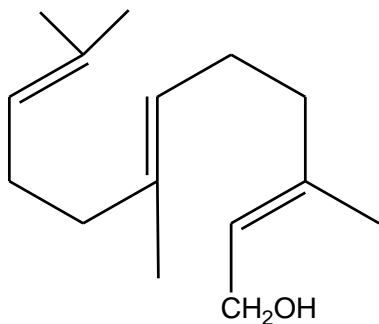
Fenquil alcohol



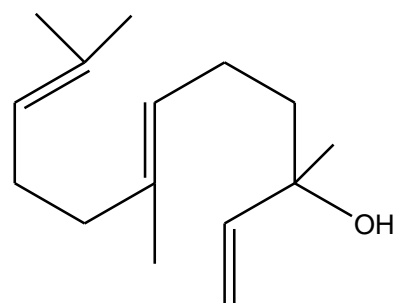
α -Fenqueno

4.2.2 Sesquiterpenos. Los sesquiterpenos forman la fracción de los aceites esenciales de más alto punto de ebullición. Ellos se forman por la unión de tres unidades de isopreno. Los sesquiterpenos son compuestos insaturados y pueden ser acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, y tricíclicos¹⁵.

4.2.2.1 Sesquiterpenos Acíclicos.

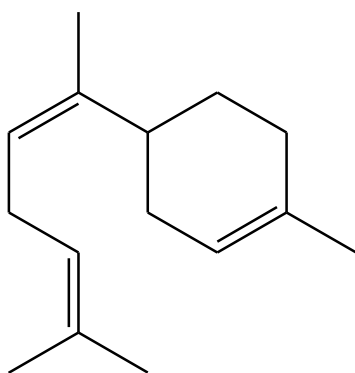


Farnesol

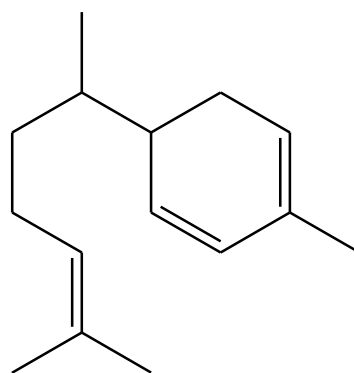


Nerolidol

4.2.2.2 Sesquiterpenos monocíclicos.

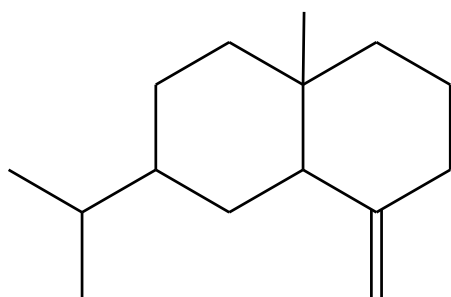


α -Bisaboleno

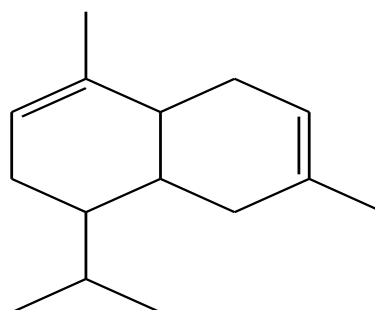


Zingibereno

4.2.2.3 Sesquiterpenos bicíclicos.



β -Salineno



α -Cadineno

4.3 MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales se pueden extraer de las muestras vegetales mediante varios métodos como son: expresión, destilación con vapor de agua, extracción con solventes volátiles, extracción con fluidos supercríticos (en éste método no se obtiene un aceite esencial, sino un extracto), hidrodestilación asistida por la radiación de microondas, etc.

4.3.1 Expresión. Este método es utilizado para extraer esencias de frutos cítricos. El aceite esencial está contenido en numerosas celdillas distribuidas en el pericarpio (flavedo, parte coloreada exterior de la corteza). Exprimiendo la corteza se rompen las celdillas y sale de ellas el aceite, que es separado y clarificado por centrifugación, filtración u otro procedimiento^{10, 16}.

4.3.2 Extracción con solventes volátiles. Se emplea para extraer aceites de las flores. Está basado en el hecho de que los disolventes volátiles (éter de petróleo, alcohol, cloroformo, etc.) penetran rápidamente los pétalos y disuelven, con las ceras y algunas materias colorantes, casi todas las sustancias odoríferas naturales. 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^{12, 13}.

4.3.3 Destilación por arrastre con vapor de agua. Es el método más común de separar los aceites esenciales del material de la planta. Aquí la muestra vegetal generalmente fresca y cortada en trozos pequeños, es encerrada en una cámara inerte y sometida a una corriente de vapor de agua sobrecalentado, la esencia así arrastrada es posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa. Se utiliza a nivel industrial debido a su alto rendimiento, la pureza del aceite obtenido y porque no requiere tecnología sofisticada.

Son muchos los estudios realizados sobre la composición de aceites esenciales de diversas plantas, donde el método más utilizado para la extracción de la esencia a partir del material vegetal, es la destilación con vapor de agua. Según se reporta en diferentes artículos científicos consultados^{12, 17, 18, 19}.

4.3.4 Extracción con fluidos supercríticos. El método de 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 líquido supercrítico (por ejemplo bióxido de carbono líquido), las sustancias son así solubilizadas y arrastradas y el líquido supercrítico que actúa como solvente extractor, se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente, finalmente se obtiene un extracto, que además del aceite contiene parafinas y ceras cuticulares entre otras sustancias. 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^{20,21}.

4.3.5 Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas. Este método se lleva a cabo utilizando un equipo de destilación tipo clewenger, el material vegetal picado en trozos de 2 a 3 cm sumergido en agua dentro de un balón, se pone en el interior de un horno microondas. La hidrodestilación es un método adecuado para extraer el aceite esencial del material vegetal, siendo selectivo para ciertas especies químicas. Se requiere de menor cantidad de operaciones y parámetros para controlar comparado con la extracción por fluidos supercríticos. Además es más rápida y emplea menos disolvente que los procedimientos de extracción líquida tradicionales, hay mejor aprovechamiento de la energía y el tamaño de muestra puede ser muy variado².

4.4 EUCALIPTO

El *Eucalyptus* es un género de plantas perteneciente a la familia **Myrtaceae**, la cual comprende cerca de 800 especies, dichas plantas frecuentemente tienen en todos sus órganos células o glándulas oleíferas de aceites esenciales, por lo que despiden un olor alcanforáceo agradable^{22,23}.

El origen del eucalipto es Australia y Tasmania, donde fue descubierto por La Billardiére a fines del siglo XVIII. En la actualidad se cultiva con intensidad prácticamente en todos los países tropicales, subtropicales y en casi todas las partes del mundo, por su contenido de aceite. La primera extracción del aceite etéreo en gran escala se efectuó en Argelia y California, y en la India, Italia, y Sudáfrica, desde el año de 1880.

Las especies de eucalipto son ampliamente cultivadas para la producción de madera, la cual encuentra uso como leña, material de construcción, papel y combustible industrial. Las plantas de eucalipto se identifican por su calidad y cantidad de aceites esenciales que son ampliamente usados en todas partes del mundo, como especias, sabores, perfumes y materias primas industriales y farmacéuticas. También se siembran en gran escala para sanear terrenos bajos y pantanosos que sirven de morada a las larvas del mosquito anofeles y otros insectos causantes de enfermedades. El efecto logrado es consecuencia principalmente de la absorción de agua por parte de estas plantas que tienen un desarrollo acelerado, convirtiendo los terrenos cenagosos en tierras secas.

El eucalipto se encuentra ampliamente difundido en Colombia, principalmente las especies *E. globulus*, *E. grandis*, *E. maculata*, *E. robusta*. La especie *E. globulus* se cultiva en la sabana de Bogotá y en otros lugares del país desde hace unos 150 años; pero solamente en las últimas décadas se ha cultivado con fines

comerciales. En regiones del Valle y del Cauca hay extensas zonas cultivadas con *E. grandis* con fines industriales ²³.

El eucalipto es un árbol maderable que en su hábitat natural puede alcanzar hasta 100 o más metros de altura. El tronco es recto, poco ramificado, y de su superficie frecuentemente se desprenden capas delgadas de corteza, en un proceso parecido a una descamación. Hojas simples, alternas y enteras. Flores y frutos relativamente pequeños. En el árbol adulto, las hojas son largas y estrechas, ligeramente curvadas, puntiagudas y de bordes enteros, lampiñas y endurecidas, sostenidas por un pecíolo de 1.5 a 2.5 centímetros. De la base al ápice se distingue el recorrido de una vena de color claro, y, por transparencia, se pueden observar otras venas secundarias que se desprenden de la principal y se dirigen a los bordes. Observadas a contraluz se pueden apreciar en las hojas numerosas manchas pálidas que corresponden a glándulas donde se almacenan esencias. Por eso al rasgar las hojas con la mano se percibe el olor característico del aceite esencial del eucalipto, con su componente activo el 1,8-cineol.

4.4.1 Aceite esencial de eucalipto. Tradicionalmente el eucalipto se ha usado como planta medicinal, ha sido fuente de fitomedicamentos y de principios activos. Su aceite esencial es muy apetecido por sus propiedades medicinales, es extraído por destilación al vapor de las hojas, es una de las esencias más antisépticas del mundo vegetal, y se usa en toda una amplia gama de infecciones como la fiebre escarlata, la gripe, las paperas y las fiebres tifoideas.

Las hojas contienen tanino, resina, ácidos grasos, ceras, etc., y, sobre todo, esencia de eucalipto, que operando con hojas secas, varía desde 1,2 hasta 3,0%. Esta esencia se compone de cineol o eucaliptol, que predomina hasta alcanzar más del 80% de la esencia.

Las hojas contienen un aceite de composición variable, pero que generalmente contiene 1,8-cineol ($C_{10}H_{18}O$) como componente mayoritario. Los principales compuestos químicos encontrados en el aceite esencial son: pineno, canfeno, aldehído valerianico, aldehído butílico, aldehído caproico; alcohol etílico, alcohol amílico; ácido fórmico, ácido acético esterificados; 1,8-cineol, α -pineno, aromadendrina, β -pineno, β -sitosterol, ácido betulínico, carvona, cariofileno, citral, citronela, citronelol, acetato de citronelilo, eugenol, geraniol, hidroxicitronelal, limoneno, linalol, mircenol, p-cimeno, terpinoleno, etc.

En la actualidad el aceite esencial se utiliza principalmente para infecciones y problemas bronquiales. Recientes investigaciones sugieren que es un antibacteriano muy potente. También se han reportado propiedades como antiséptico, antiinflamatorio, antiespasmódico, expectorante, analgésico para tratamiento de cefalea, febrífugo, hipoglucemiante y para problemas de la voz ²⁴.

4.4.2 *Eucalyptus grandis*. El árbol de *Eucalyptus grandis* crece rápidamente y es de tronco recto muy alto. La especie ha sido ampliamente plantada para la producción de pulpa de papel, perchas y materia prima para madera.

Las investigaciones sobre la composición química del aceite esencial de las hojas de *E. grandis* realizadas en Uruguay, Australia, y Turquía mostraron que el principal componente fue 1,8-cineol. Se reportó que el aceite de las hojas de *Eucalyptus grandis* crecido en Burundi estuvo compuesto principalmente por α -pineno, en tanto que el α -pineno y p-cimeno fueron los principales constituyentes del aceite de las hojas de la planta del Congo. Se encontró que el aceite de las hojas del *Eucalyptus grandis* cultivado en Etiopía contiene predominantemente α y β -pinenos.

El estudio hecho sobre la composición química del aceite esencial obtenido por hidrodestilación de las hojas de la especie *Eucalyptus grandis* cultivada en Nigeria presentó un rendimiento de 4.7% (w/w) el cual fue expresado como el porcentaje de materia seca.

El análisis del aceite esencial fue realizado por cromatografía de gases empleado el detector de conductividad térmica (TCD) y también por cromatografía de gases/espectrometría de masas. Los resultados obtenidos mostraron que el aceite esencial de *Eucalyptus grandis* caracterizado fue rico en compuestos monoterpenoides encontrándose en abundancia el α -pineno (30.4%), terpinen-4-ol (10.7%), (E)- β -ocimeno (9.4%), borneol (8.4%) y ci-terpineol (8.0%)²⁵.

4.5 CROMATOGRAFÍA DE GASES

Los aceites esenciales de diversas plantas son mezclas complejas en su mayoría constituidas por monoterpenos, monoterpenoides, sesquiterpenos, sesquiterpenoides, y otras sustancias. A partir de dichos aceites es posible realizar su aislamiento mediante la utilización de uno o varios métodos cromatográficos tales como la cromatografía en columna, en capa fina y HPLC. Sin embargo actualmente se utilizan técnicas de separación más eficientes y rápidas como la cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC, y la cromatografía de gases (GC), así como también combinaciones "ON-LINE" HPLC-GC-MS¹².

Esta última técnica gracias al desarrollo reciente de columnas capilares de alta resolución, permite analizar mezclas complejas presentes en aceites esenciales, e identificar los componentes a partir de los tiempos de retención a través de los denominados Índices de Retención de Kovats (Ik). Estos valores son característicos para cada componente y existen bases de datos con los índices de muchos componentes de aceites esenciales¹³.

La cromatografía de gases ha sido por muchos años el método de preferencia para el análisis de aceites esenciales. Además los constituyentes de los aceites esenciales son identificados usando una combinación de diferentes técnicas cromatográficas incluyendo cromatografía de gases con detector de ionización

en llama (GC-FID), cromatografía de gases con detección olfantométrica y cromatografía de gases en combinación con espectrometría de masas (GC-MS)
12,26

Adicionalmente, la técnica acoplada Cromatografía de Gases-Espectrometría de masas, permite obtener el espectro de masas de cada componente con el cual se obtiene el peso molecular e información estructural. Así mismo existen bases de datos con los espectros de masas de muchos componentes, por lo cual el índice de Kovats (determinado en dos columnas de diferente polaridad) y el espectro de masas son criterios para la asignación química de muchos componentes de aceites esenciales, no solo monoterpenos sino también otros tipos de sustancias características de dichos aceites.

La cromatografía de gases es un método analítico empleado ampliamente en la separación, identificación y determinación de los componentes químicos en mezclas complejas. En ésta técnica, los componentes de una muestra que se vaporiza son separados como consecuencia de ser repartidos entre una fase móvil gaseosa y una fase estacionaria líquida mantenidas en una columna.

La cromatografía de gases consiste en que la muestra problema es inyectada en la cabeza de una columna cromatográfica donde es volatilizada y conducida a través de la columna mediante un gas portador inerte que actúa como fase móvil, de este modo se efectúa la separación de los distintos componentes de la muestra, basándose en las diferencias en volatilidad y solubilidad de la mezcla de solutos, lo cual origina una distinta velocidad de los solutos a su paso por la columna, como consecuencia van siendo detectados uno a uno según el orden de llegada de cada uno al sistema de detección. El detector registra la información en un cromatograma que muestra una serie de picos. La posición de los picos (tiempo de retención) se utiliza con fines cualitativos mientras que las áreas bajo los picos se relacionan con la concentración de cada componente^{27, 28, 29}.

Los componentes básicos de un cromatógrafo de gases se describen a continuación:

4.5.1 Sistema de suministro de gas portador. El gas portador es la fase móvil en cromatografía de gases. Su función es transportar la mezcla de los solutos desde que se introduce en el sistema cromatográfico hasta su salida en el detector; pasando a través de la columna donde se produce la separación. Debe ser químicamente inerte y no interaccionar ni con la columna ni con los componentes de la mezcla. El helio es la fase móvil más común, aunque también se emplean argón, nitrógeno, e hidrógeno²⁷.

El gas portador utilizado debe ser de gran pureza, es decir, libre de contaminantes tales como agua, oxígeno e hidrocarburos que pueden afectar a la fase líquida.

4.5.2 Sistema de inyección de la muestra. El método más común de inyección de muestra se hace utilizando una jeringa, para inyectar una muestra líquida o gaseosa a través de un diafragma o “septum” de goma de silicona, en una cámara de vaporización instantánea situada en la cabeza de la columna (la cámara de muestra normalmente está unos 50°C por encima del punto de ebullición del componente menos volátil de la muestra).

4.5.3 Sistema de termostatación u horno. Para reproducir los tiempos de retención se necesita controlar la temperatura de la columna hasta décimos de grado. Por esta razón, la columna se introduce dentro de un horno termostatación. La temperatura óptima de la columna depende de los puntos de ebullición de los componentes de la mezcla y del grado de separación requerido. Una temperatura que sea aproximadamente, igual o ligeramente superior al punto de ebullición medio de una muestra da como resultado un período razonable de elución (2 a 30 minutos). Para muestras con un amplio intervalo de ebullición, a menudo es conveniente emplear una programación de temperatura, con lo que se aumenta la temperatura de la columna bien de forma continua bien por etapas, al mismo tiempo que tiene lugar la separación³⁰.

4.5.4 Columnas. Tanto las columnas empacadas como las tubulares abiertas (o capilares) se emplean en la cromatografía gas-líquido. Las columnas empacadas, pueden acomodar muestras más grandes. Las tubulares abiertas, son de considerable importancia gracias a su resolución sin paralelo.

Las columnas capilares, fabricadas comúnmente de vidrio o de sílice fundida, tienen diámetros interiores de 0.25 a 0.50 mm y longitudes de 25 a 50 m. sus superficies internas están recubiertas con una capa delgada de la fase estacionaria.

Las columnas capilares de sílice fundida tienen una resistencia adicional, por una recubierta externa de (poli)imida, sustancia que las hace muy flexibles y fuertes de modo que se pueden enrollar en bobinas.

4.5.5 Fases estacionarias. Las propiedades deseables para la fase líquida inmovilizada en una columna cromatográfica incluyen: -baja volatilidad (idealmente, el punto de ebullición del líquido debe ser 100°C por arriba de la máxima temperatura de operación para la columna); -buena estabilidad térmica; -inercia química; -baja viscosidad; -disolver los a los solutos de la mezcla en distinta extensión, es decir, interaccionar selectivamente con los solutos.

La selección adecuada de una fase estacionaria es fundamental para el éxito de una separación, su elección dependerá de la composición de la muestra a separar, por ello se necesita tener la máxima información de la misma antes de iniciar el análisis: rango de puntos de ebullición, estructura, etc. En general, la fase líquida debe tener una estructura química similar a la de los componentes de la muestra².

Los solutos polares se separan mejor en fases estacionarias polares y los no polares en fases parafínicas, con lo cual se aplica el principio de “lo semejante se disuelve en lo semejante”, en donde “lo semejante” se refiere a las polaridades del analito y el líquido inmobilizado. Las fases estacionarias polares contienen grupos funcionales como -CN, -CO y -OH. Las fases estacionarias del tipo de hidrocarburos y los dialquilsiloxanos son no polares, en tanto que las fases poliéster son altamente polares. Los analitos polares incluyen alcoholes, ácidos, y aminas; los solutos de polaridad media incluyen éteres, cetonas y aldehidos. Los hidrocarburos saturados son no polares. Generalmente, la polaridad de la fase estacionaria debe coincidir con la de los componentes de la muestra. Cuando la coincidencia es buena, el orden de elución es determinado por el punto de ebullición de los eluyentes ²⁸.

4.5.6 Sistema de detección. Los dispositivos para la detección en la cromatografía gas-líquido deben responder rápidamente a concentraciones muy pequeñas de solutos a medida que salen de la columna. El tiempo durante el cual un pico pasa el detector normalmente es de un segundo, por lo cual es necesario que el dispositivo sea capaz de responder satisfactoriamente durante este breve periodo.

La cromatografía de gases posee un sistema continuo de detección por el que pasa el gas portador con los solutos separados procedentes de la columna. Su misión es poner de manifiesto el paso de los analitos originando una señal eléctrica que se amplifica y registra dando lugar al cromatograma. El fundamento del detector es medir de forma continua una propiedad física o química del gas que circula permanentemente a su través. Realiza dos funciones primordiales: a) indicar el momento exacto en que pasa un soluto (o su máxima concentración) definiendo los tiempos de retención para el análisis cualitativo; b) originar una señal proporcional a la cantidad de soluto que pasa a su través, para fines cuantitativos.

En cromatografía de gases, un detector ideal tiene las siguientes características: - adecuada sensibilidad; -buena estabilidad y reproducibilidad; -respuesta lineal; - tiempo de respuesta corto; -sencillez de manejo y mantenimiento; -respuesta uniforme para una amplia variedad de especies químicas, o, alternativamente, una respuesta predecible y selectiva hacia una o más clases de solutos.

Uno de los detectores más utilizados en cromatografía de gases es el detector de ionización en llama (FID), el cual se basa 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.

El detector de ionización en llama posee una elevada sensibilidad ($\sim 10^{-13}$ g/s), de respuesta lineal ($\sim 10^7$), y un bajo ruido. Por lo general es resistente y fácil de utilizar ³⁰.

4.6 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE ALGUNOS ACEITES ESENCIALES

En diversas publicaciones científicas se reporta el estudio de la composición química de muchos aceites esenciales. En seguida se presentan los análisis para algunos aceites esenciales y especialmente los del género *Eucalyptus*.

Se hizo un estudio para determinar la composición química de los aceites esenciales de diferentes especies de *Eucalyptus*, empleando los métodos vibracionales, espectroscopía raman de transformada de Fourier e infrarrojo cercano y espectroscopía infrarroja de reflexión total atenuada y métodos cromatográficos estándar. Se logró demostrar que los aceites esenciales de estas especies pueden ser caracterizados por dos técnicas de espectroscopía vibracional utilizando la información espectral de los terpenoides puros. Los análisis espectroscópicos están basados en las bandas claves de las sustancias volátiles individuales. También se encontró que los datos espectroscópicos se correlacionan muy bien con los obtenidos por cromatografía de gases.

El aislamiento de los aceites esenciales de las hojas fue desarrollado usando el método clásico de hidrodestilación. Éstos se analizaron por GC-FID y GC-MS, usando la columna HP-innowax. La identificación de la mayoría de los compuestos detectados se basó en su tiempo de retención relativo en comparación al de sustancias puras estándar³.

Se realizó un estudio sobre la biotransformación de 1,8-cineol, el principal producto de los aceites de eucalipto, la identificación de los productos obtenidos fue realizada por GC-FID, GC-MS, etc. Se trabajó con la columna CARBOWAX y la cuantificación se hizo utilizando el estándar interno óxido de limoneno⁴.

Se determinó la composición química de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia **Verbenacea** mediante, el análisis cromatográfico de las muestras de aceite esencial. Para la extracción del aceite se emplearon diferentes métodos de extracción, entre ellos hidrodestilación, hidrodestilación asistida por la radiación de microondas, destilación con vapor-extracción con solvente simultánea y extracción con fluido supercrítico, llevada a cabo en un extractor soxhlet de alta presión².

Se investigó la composición química del aceite esencial de *Psidium caudatum* Mc Vaugh, (una planta perteneciente a la familia **Myrtaceae**, por cromatografía de gases de alta resolución (HPLC) y HPLC – MS²⁰.

5. METODOLOGÍA

5.1 MATERIALES Y EQUIPOS

Tabla No1 Materiales y equipos para análisis del aceite esencial de eucalipto

MATERIAL O EQUIPO	MARCA
Picnómetro	SCHOT
Termómetro	-
Balanza analítica	METTLER AJ150
Refractómetro	ABBE MARK II Modelo No 10480
Plancha	CORNING MODEL PC-420
Thermolyne	Type 7200 Stir Light
Refrigerador	SAMSUNG
Horno	Binder
Equipo de destilación por arrastre con vapor para extracción de aceites esenciales	-
Equipo de ultravioleta – visible	INTRALAB
Equipo de infrarrojo	IR 200 Spectrometer Thermo
Cromatógrafo de gases	HEWLETT PACKARD Series GC System 6890 con Detector de ionización de llama
Jeringa para cromatografía de gases,	HAMILTON de 5.0µL Microliter TM numero 75.
Septa de PTFE / goma	supelco
Ultrasonido	Branson 1510.
Columna capilar	HP – INNOWAX (crosslinked Polyethylene Glycol) 19091N – 102.
Filtro Acrodisc GHP, 0.45 µm	supelco

5.2 REACTIVOS

Tabla No 2 Reactivos para análisis del aceite esencial de eucalipto

REACTIVO	MARCA
Sulfato de sodio anhidro	pro analysi MERCK
Glicerina	Comercial
Cloroformo,	HPLC J.J. Backer
Acetona	GR, EM SCIENCE MERCK KGaA
n – Hexano	GR EM SCIENCE MERCK
Éter etílico	pro analysi MERCK 99.9%
Metanol	pro analysi MERCK 99.9%
Etanol absoluto	pro analysi MERCK 99.9%
Diclorometano	GR.EMD
Hidróxido de sodio	pro analysi MERCK
Fenolftaleína	Comercial
ftalato ácido de potasio	Comercial
Eucalyptol	99% GC, Fluka
α - Terpeneol	99%, ACROS ORGANICS
α - Píneo	97.1% grado analítico, MERCK.
β -Citronelol	90-95 % Fluka
yodo	Comercial

5.3 PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DEL FOLLAJE DE *Eucalyptus grandis*

5.3.1 Recolección de la muestra. El follaje se recolectó en la finca “La claridad” propiedad de la empresa Smurfit Cartón de Colombia y administrada por la cooperativa agroforestal del Cauca, COOTRAFORC. La finca esta ubicada en el municipio de Popayán, a una altitud de 1737 m.s.n.m. y tiene una temperatura promedio de 19 °C.

Los árboles seleccionados para muestreo tienen una altura entre 15 y 30 metros, su edad es aproximadamente de 6 años. El follaje se encuentra a partir del segundo tercio del fuste hacia arriba y la mayor concentración de hojas se halla en la copa del árbol. Las hojas jóvenes son pequeñas y alargadas y se encuentran principalmente en la copa del fuste, las hojas adultas son anchas y redondeadas y están ubicadas debajo de la copa.

La población de una hectárea de *Eucalyptus grandis* es 1111 árboles en actividad forestal (cosecha), el muestreo se realizó en forma aleatoria de zigzag¹.

5.3.2 Tratamiento previo de la muestra antes de la extracción. El follaje se recolectó en forma manual y se llevó hasta el laboratorio donde fue secado a temperatura ambiente sin ser expuesto a la luz solar, posteriormente se almacenó por un período de 20 días en un ambiente fresco, seco y protegido del sol en condiciones adecuadas para conservarlo durante el tiempo necesario para realizar el proceso de extracción del aceite.

Las extracciones de aceite esencial a partir del follaje se harán lo mas pronto posible haya sido llevada la muestra al laboratorio y hasta los 20 días siguientes.

5.3.3 Extracción del aceite esencial aplicando el método de destilación por arrastre con vapor. Para extraer el aceite esencial de *Eucalyptus grandis* se utilizará el equipo de destilación por arrastre con vapor de la planta piloto del Grupo de Investigación en Química Analítica Ambiental (GIQA) el cual consta de los siguientes componentes: un generador de vapor (autoclave), un reactor (vaso de alta presión) y un condensador.

El proceso de extracción del aceite se hizo a 110°C y a una presión de 1 psi, condiciones de trabajo que fueron constantes durante todo el proceso de destilación.

5.3.4 Determinación del rendimiento de aceite esencial

El rendimiento del aceite se cuantificó teniendo en cuenta variables como, el tiempo de destilación y el tiempo transcurrido desde que se recolecta la muestra en el bosque hasta su destilación en el laboratorio.

5.3.4.1 Tiempo de destilación. Para determinar el tiempo de extracción en el cual se obtiene el máximo rendimiento del aceite esencial se hicieron extracciones por triplicado para 1, 2 y 3 horas de haberse iniciado el proceso de destilación.

5.3.4.2 Tiempo de recolección. También se evaluará el rendimiento del aceite según el tiempo de recolectada la muestra, para ello se hicieron extracciones por triplicado de los días 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10 y 20.

5.3.5 Aislamiento y almacenamiento del aceite destilado para los análisis físicos y químicos. El aceite esencial obtenido en el proceso de destilación por arrastre con vapor, se aisló de la fase acuosa por diferencia de densidades en un embudo de separación. Posteriormente el agua residual se secó adicionándole el reactivo sulfato de sodio anhidro y finalmente se filtró.

Una vez es obtenido el aceite esencial completamente seco, se viertió en viales color ámbar y se guardó en el refrigerador a una temperatura de 5°C donde quedó protegido de la luz, el calor y el aire.

5.3.6 Determinación de propiedades físicas y químicas. Las muestras de aceite esencial adecuadamente almacenadas se les realizó pruebas físicas que permitieron establecer la calidad y pureza del aceite. Estas pruebas fueron hechas por triplicado.

5.3.6.1 Densidad. La densidad del aceite se determinó utilizando un picnómetro de 10 mL para ello se pesó el picnómetro vacío y luego lleno con agua a una temperatura de 22 °C, también se pesó el picnómetro con la muestra de aceite pura a la misma temperatura y posteriormente se calculó la densidad³².

5.3.6.2 Índice de refracción. Para esta prueba se tomó una gota del aceite y se midió su índice de refracción en un refractómetro de Abbe previamente calibrado. La lectura se realizó a una temperatura de 23°C ¹³.

5.3.6.3 Punto de volatilización. Se determinó el punto de volatilización empleando el método siwoloff's. Para ello se tomó un tubo de ensayo pequeño, al cual se adicionaron dos gotas del aceite, en su interior se colocó un capilar cerrado en uno de sus extremos e invertido, después todo el conjunto se fijó a un termómetro y se introdujo en un baño de glicerina, se aumentó la temperatura del sistema gradualmente hasta que se observó un desprendimiento rápido y continuo de burbujas del interior del capilar, esta temperatura se tomó como el punto de volatilización del aceite esencial³¹.

5.3.6.4 Solubilidad. Se ensayó la solubilidad del aceite en soluciones etanólicas al 95%, 90%, 80%, 70%, 60% y 50% en peso. Para ello se tomó 1 mL del aceite y se vertió en una probeta. A continuación se añadió lentamente en porciones

pequeñas la solución etanólica, agitando fuertemente luego de cada adición, hasta encontrar el número de volúmenes requeridos para disolver el aceite. También se determinó la solubilidad del aceite en los siguientes solventes: eter etílico, hexano, acetato de etilo, diclorometano, metanol, cloroformo, y acetona.

5.3.6.5 Índice de acidez libre. Se tomarón 2.5 gramos del aceite esencial y se diluyeron en 15 m L de alcohol absoluto, a esta solución se le agregaron 2 gotas de fenolftaleína al 1%. Se titularon los ácidos libres con una solución estandarizada de hidróxido de sodio 0.1N, la aparición de una coloración roja persistente por más de 10 segundos se consideró como el punto final ^{13, 32}.

5.3.7 Análisis espectroscópicos del aceite esencial y de los patrones α -pineno y eucaliptol

5.3.7.1 Espectro infrarrojo. Se tomó el espectro infrarrojo a los patrones α -pineno y eucaliptol y a la muestra de aceite esencial de eucalipto, colocando una gota de cada sustancia en una celda de KBr.

5.3.7.2 Espectro ultravioleta visible. El espectro UV-visible se tomó a cada patrón (eucaliptol y α -pineno) y a la muestra, preparando soluciones diluidas de 2 ppm, para cada uno. El rango de longitudes de onda en el que se hizo el barrido es de 190 a 700 nm.

5.4 ANÁLISIS DEL ACEITE POR CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECTOR DE IONIZACIÓN EN LLAMA (GC- FID)

La técnica analítica de separación que se aplicó para determinar los metabolitos secundarios α -pineno y eucaliptol en la muestra de aceite esencial, fue la cromatografía de gases, puesto que es la técnica que ofrece mejor poder de resolución para compuestos orgánicos volátiles y porque es la técnica más utilizada para el análisis de éste tipo de sustancias²⁹.

Los componentes α -pineno y eucaliptol en el aceite esencial de *Eucalyptus grandis* se determinaron utilizando el cromatógrafo de gases HP 6890 con detector de ionización en llama (FID). Se empleó la columna capilar HP-INNOWAX de pared recubierta con (poli)etilenglicol entrecruzado y gas portador Helio. Inicialmente se trabajó con los patrones de eucaliptol, α -pineno y α -terpineol para encontrar sus tiempos de retención y una adecuada separación, aplicando las siguientes condiciones: el inyector split /splitless (250 °C, relación split 1:30), para el detector de ionización de llama (FID) (250 °C). La temperatura se mantuvo a 50 °C durante 5 min después de la inyección, luego se programó a 4 °C /min hasta 220 °C. El volumen de inyección fue de 0.2 μ L de las respectivas soluciones de cada patrón en etanol ^{2, 7, 29, 33, 34}.

5.4.1 Optimización de las condiciones cromatográficas para la separación, identificación y posterior cuantificación de dos metabolitos secundarios en el aceite esencial de eucalipto. Inicialmente se prepararon soluciones madre de cada uno de los estándares a una concentración de 1000 ppm en etanol, tomando 12.00 y 10.93 μL directamente de los reactivos puros α -pineno y eucaliptol respectivamente. A partir de las soluciones concentradas se prepararon soluciones de menor concentración como 2, 5, 10, 20 y 30 ppm para cada estándar.

Basándose en estudios previos realizados a los aceites esenciales de la especie del género *Eucalyptus* se programaron las temperaturas para el inyector, el horno y el detector, posteriormente se ensayó inyectando los patrones individualmente a diferentes concentraciones en orden creciente de concentración con el fin de confirmar la presencia del componente que se quiere identificar según su tiempo de retención. Se continuó modificando la temperatura del horno hasta conseguir una buena resolución y un tiempo de corrida adecuado, que permitió ahorrar gas portador y hacer más rápido el análisis³.

El flujo óptimo de la fase móvil para la columna HP-INNOWAX recubierta con fase estacionaria de (poli)etilenglicol se determinó mediante curva de Van Deemter. Para ello se inyectó una solución de concentración conocida del estándar α -pineno en etanol, a diferentes flujos.

5.4.2 Estandarización del método para determinar eucaliptol y α -pineno en el aceite esencial del follaje de *Eucalyptus grandis*. En el procedimiento de estandarización se evaluarán los parámetros estadísticos de calidad que servirán como criterios de confianza del método analítico; estos parámetros son: exactitud, precisión, linealidad, sensibilidad (límite de detección y límite de cuantificación), y porcentaje de recuperación.

5.4.2.1 Linealidad. La linealidad de un método analítico se refiere a la proporcionalidad entre la concentración de analito y la señal producida por el instrumento. Este parámetro se evaluó para cada estándar, de la siguiente forma:

Para α -pineno se hicieron dos curvas de calibración, preparando seis diluciones para cada curva a partir de una solución de referencia del patrón de 1000 ppm. De igual forma se harán dos curvas de calibración para el patrón eucaliptol. Cada solución se inyectará por triplicado y con los datos de cada curva se determinará la regresión lineal.

5.4.2.2 Sensibilidad. La sensibilidad de un método analítico corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo. Los parámetros para evaluar la sensibilidad de un método son los límites de detección y de cuantificación.

Para encontrar el límite de detección y de cuantificación de los patrones α -pineno y eucaliptol se hará una curva de calibración para cada uno en un rango de concentraciones bajas, posteriormente se calculará la regresión lineal correspondiente y mediante cálculos estadísticos se determinarán los límites de detección y de cuantificación respectivos.

Límite de detección, es la concentración de analito que produce una señal igual a tres veces el nivel de ruido pico a pico de la línea de referencia, corresponde a la menor concentración de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra y se expresa en unidades de concentración (% , ppm ,ppb , etc). El límite de detección se calculará con la ecuación (1) según la definición de IUPAC para este parámetro³⁵.

$$Y = Y_b + 3 S_b \quad (1)$$

Límite de cuantificación, corresponde a la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables y se expresa también en unidades de concentración. El límite de cuantificación se calculará con la ecuación (2) según la definición de IUPAC para este parámetro²⁸.

$$Y = Y_b + 10 S_b \quad (2)$$

5.4.2.3 Precisión. La precisión describe la reproducibilidad de las mediciones; es decir que tan cercanos están los resultados que se han obtenido exactamente de la misma forma. En general, la precisión de un método analítico se obtiene fácilmente mediante la simple repetición de la medida. La precisión se expresa en términos de la desviación estándar (S) y la desviación estándar relativa o coeficiente de variación (RSD), que se calcula utilizando las ecuaciones (3) y (4), respectivamente³⁶.

$$S = (\sum (X_i - X)^2 / N-1)^{1/2} \quad (3)$$

$$RSD = S \times 100 / X \quad (4)$$

Donde X_i = valor de una sola medida

X = promedio

N = número de mediciones repetidas

5.4.2.4 Exactitud. El término exactitud indica qué tan cercana está una medición de su valor verdadero o aceptado. La exactitud nunca puede determinarse exactamente ya que nunca puede conocerse el verdadero valor de una cantidad; así, en su lugar se debe usar un valor aceptado.

Para determinar la exactitud del método de cuantificación de α -pineno y eucaliptol se aplicará la prueba estadística t-student

5.4.3 Elección del método de cuantificación. En cromatografía de gases la precisión más elevada se obtiene utilizando estándares internos, por tanto el método de patrón interno es el más utilizado para la cuantificación mediante ésta técnica ya que no es necesario medir exactamente las cantidades inyectadas ni conocer la respuesta del detector o que ésta permanezca constante, pues ningún cambio en la respuesta alterará la relación de áreas. La principal desventaja del método es la de encontrar un estándar o patrón que no interfiera con algún componente de la muestra.

El estándar interno debe tener los requisitos siguientes:

- Debe separarse bien de los otros picos.
- Debe eluirse muy cerca de los picos que interesan
- Debe tener una concentración aproximada a la de la sustancia que se determina.
- Debe tener una similitud estructural con la sustancia que se determina.

En la cuantificación de los metabolitos secundarios α -pineno y eucaliptol en la muestra de aceite esencial de eucalipto se pretende utilizar el estándar α -terpineol como patrón interno porque es un componente que se encuentra disponible en el laboratorio, a pesar de que en estudios previos de la composición química de aceites esenciales de eucalipto se ha encontrado que éste componente está presente, aunque en pequeña cantidad. Además es el método más utilizado para la determinación cromatográfica de los componentes de un aceite esencial, según los artículos científicos consultados^{25, 37}.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.0 EXTRACCIÓN

La destilación del aceite se hizo en un equipo de destilación que consta de una autoclave de acero inoxidable donde se genera el vapor que se conduce hasta un recipiente herméticamente cerrado también de acero inoxidable, el cual contiene la muestra. Este recipiente se une a un condensador, que refrigera el vapor, obteniéndose una mezcla de agua y aceite. Finalmente el aceite es separado de la fase acuosa en un embudo de adición.

6.1 RENDIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL EXTRAÍDO APLICANDO EL MÉTODO DE DESTILACIÓN POR ARRASTRE CON VAPOR.

6.1.1 Tiempo de destilación. Se ensayaron diferentes tiempos de extracción, con una misma muestra de follaje, determinando el rendimiento de aceite esencial a los 60, 120 y 180 minutos de iniciada la destilación. El anterior procedimiento se hizo por triplicado para tres muestras distintas y Los resultados del porcentaje de rendimiento obtenido a los diferentes tiempos de destilación se presentan en la tabla No 3.

Tabla No3 Datos de rendimiento de aceite esencial de eucalipto según tiempo de destilación

Tiempo de destilación (min)	Peso de muestra (g)	Peso de aceite (g)	S	RSD %	% Rendimiento	% Rendimiento promedio
60	1000	6.241	0.038	0.603	0.624	0.622
	1000	6.183			0.618	
	1000	6.253			0.625	
120	1000	10.392	0.396	3.988	1.039	0.993
	1000	9.701			0.970	
	1000	9.701			0.971	
180	1000	13.944	0.615	4.644	1.394	1.325
	1000	13.027			1.303	
	1000	12.774			1.277	
240	1000	0	-	-	-	-

El rendimiento determinado con respecto al tiempo de destilación (ver tabla No 3) cuando ha transcurrido una hora del proceso equivale aproximadamente al 50 %. Al cabo de dos horas más de extracción se dobla el rendimiento obtenido en la primera hora. En estudios realizados al aceite esencial de *Eucalyptus grandis* en los cuales se ha determinado el rendimiento con respecto al tiempo de

destilación, se ha encontrado que el rendimiento aumenta sí se prolonga el tiempo de destilación ^{38, 39}.

6.1.2 Tiempo de recolección

Tabla No4 Rendimiento de acuerdo al tiempo de recolección

Día de extracción	Peso muestra (g)	Peso aceite (g)	Volumen aceite (mL)	% Rendimiento (P/P)
1	1000	14.4539	16.2	1.445
2	1000	13.8785	15.6	1.388
3	1000	13.9437	15.6	1.394
4	1000	12.1667	13.6	1.217
5	1000	12.7741	14.3	1.277
6	1000	7.2200	8.1	0.722
10	1000	6.5673	7.4	0.656
20	1000	6.7050	7.5	0.671

Se evaluó el rendimiento del aceite esencial con respecto al tiempo transcurrido entre la recolección del follaje y la extracción del aceite. Para ello se llevó la muestra al laboratorio el mismo día de talados los árboles, es decir, lo más fresca posible y en estas condiciones se hizo una primera extracción. Las hojas se almacenaron adecuadamente evitando su exposición a la luz solar, a la humedad y demás factores que pudieran degradarla.

La extracción del aceite se realizó los días 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10 y 20. Con el fin de observar cual era el rendimiento del aceite según el tiempo de secado del follaje en las condiciones del ambiente.

Se observa en la tabla No 4 que los porcentajes de rendimiento del aceite esencial de eucalipto son altos los días 1, 2, 3, 4 y 5, a partir del día 6 empieza a disminuir significativamente con respecto a los tres primeros días manteniéndose casi constante hasta el día 20, este comportamiento se debe probablemente a que los componentes del aceite al ser sustancias volátiles son inestables en las condiciones de almacenamiento, lo que causa pérdidas por evaporación.

En la tabla No 4 se presentan los porcentajes de rendimiento obtenidos para los distintos días de extracción del aceite. Se encuentra que están comprendidos entre 1.445%, para el primer día y 0.656%, para el décimo día, estos porcentajes están cercanos al reportado para esta especie en el estudio que se realizó en el municipio de Buenos Aires, Cauca, donde se determinó un porcentaje de rendimiento del 1.3 %. En general el rendimiento de aceite esencial para las distintas especies del género *Eucalyptus* esta comprendido entre 0.3 y 6.0 %^{34, 39, 40}.

6.2 DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO

El aceite puro, presenta un color amarillo muy claro y un olor agradable, entre las propiedades físicas, que se determinaron, están la densidad o peso específico, el índice de refracción y el punto de volatilización, y entre las propiedades químicas el índice de acidez libre, los valores encontrados se presentan en la tabla No 5.

Tabla No 5 Propiedades físicas y químicas del aceite esencial de eucalipto

Densidad (g/mL) a 22°C	Índice de refracción $\eta_D^{23^\circ C}$	Punto de volatilización (°C)	Acidez libre mgNaOH/gAceite
0.892	1.4872	143 - 147	0.465

El índice de acidez libre determinado al aceite esencial de *Eucalyptus grandis* fue de 0.465 este es un valor bajo comparado con la acidez libre determinada para el aceite de la misma especie el cual fue de 6.871, el índice de acidez libre indica la calidad de conservación del aceite este valor aumenta con la edad del aceite, especialmente si ha sido almacenado inapropiadamente. Para evitar cambios en la acidez libre el aceite debe estar completamente seco, protegido del aire y de la luz factores que aceleran los procesos tales como oxidación de aldehídos e hidrólisis de ésteres^{1, 13, 40}.

Los aceites esenciales; están constituidos por mezclas de diversas sustancias y por tanto no tienen punto de ebullición fijo, sino que ebullicen entre límites de temperatura distantes: en general entre unos 120 y 300°C. Para el aceite de eucalipto se encontró que su punto de volatilización esta en este rango⁴⁰.

El índice de refracción sirve para revelar la existencia de sustancias extrañas en los aceites esenciales, puede oscilar aproximadamente entre 1,43 y 1,62 para temperaturas alrededor de 20°C. El valor determinado experimentalmente para el aceite esencial de eucalipto, (ver tabla No5) se encuentra en este rango y también esta dentro de los valores establecidos según el código alimentario para los aceites de eucalipto, comprendido entre 1.4780 y 1.4898⁴⁰.

La densidad del aceite de eucalipto (ver tabla No 5) esta entre los valores de los aceites volátiles hasta ahora conocidos de 0.696 y 1.188. Los aceites más ligeros que el agua son generalmente ricos en hidrocarburos, en alcoholes, en aldehídos o cetonas, como por ejemplo los aceites de eucalipto, aunque el peso específico de un aceite no es siempre constante, ya que influyen en él, el cultivo de la planta, el modo de preparación o de purificación del aceite, la edad del mismo y otros factores⁴⁰.

Se ensayó la solubilidad del aceite esencial de eucalipto en soluciones de etanol a diferentes concentraciones y también en solventes orgánicos encontrándose los resultados que se muestran en la tabla No 6.

Tabla No 6. Solubilidad de aceite esencial de eucalipto en solventes orgánicos

Solvente	Solubilidad
Solución de etanol al 95%	Soluble
Etanol absoluto	Soluble
Diclorometano	Soluble
Cloroformo	Soluble
Éter etílico	Soluble
Hexano	Medianamente Soluble
Metanol	Soluble
Acetona	Soluble

Se encontró que el aceite es insoluble en soluciones de etanol diluido a bajas concentraciones, es decir, donde el agua esta en mayor proporción con respecto al etanol, y esto se debe a que el aceite es una mezcla de muchos compuestos orgánicos que tienen mayor afinidad por solventes orgánicos, esto explica por qué el aceite se solubiliza mejor en solución etanólica al 95%. También, se puede decir que el aceite no es rico en componentes oxigenados que al formar enlaces de hidrógeno con el agua podrían aumentar la solubilidad del aceite en la fase acuosa, sino que en su composición predominan los compuestos terpénicos ^{13, 14}.

Igualmente se ensayó la solubilidad en solventes de baja, mediana y alta polaridad, observándose una gran miscibilidad con los solventes orgánicos, lo que indica que hay semejanza en el tipo de enlaces moleculares.

6.3 ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICOS

6.3.1 Análisis por espectroscopía infrarroja¹¹. El espectro infrarrojo permite detectar la presencia de grupos hidroxilo, carbonilo, anillos aromáticos, enlaces dobles C=C cis y trans, etc ¹².

A continuación se presentan las bandas de absorción más importantes del espectro de cada sustancia (ver anexos A, B , C):

Tabla No 7 Información Espectro Infrarrojo del Aceite esencial de *Eucalyptus grandis*

Banda de absorción I.R. Frecuencia, cm ⁻¹	Característica Estructural
3443.93	Tensión de O-H asociado
3067.93	Tensión C-H de alqueno
2926.97	Tensión asimétrica de metileno C-H -CH ₂ -
2872.19	Tensión simétrica de metilo C-H -CH ₂ -
2729.15	Absorción molecular de cicloalcanos
1637.33	Estiramiento de grupo C = C débil
1452.21	Deformación asimétrica de metilo - CH ₃
1375.18	Flexión simétrica de metilo -CH ₃
1263.96	Tensión C-O de éteres

El espectro de absorción I.R. de un aceite esencial proporciona valiosa información cualitativa sobre sus componentes y puede emplearse como criterio del progreso de su separación y finalmente como fuente de datos para identificar o aclarar la estructura de los compuestos aislados.

En la tabla No 7, se presentan las bandas principales encontradas en el espectro I.R. del aceite esencial de *Eucalyptus grandis* el cual brinda información general de los compuestos que pueden estar presentes. Mostrando las bandas características de los grupos funcionales, de modo que es posible identificar algunos y descartar otros.

La banda débil a 3067.93 cm⁻¹ es probablemente debida a una tensión C-H de alqueno.

En el espectro del aceite se observa una banda de absorción fuerte a 2926.97 cm⁻¹, debida a una vibración de tensión asimétrica del enlace C-H, carbono-hidrógeno de metilenos; y una banda a 2872.19 cm⁻¹ que corresponde a vibraciones de tensión simétrica del enlace C-H de grupos metilo.

Aparece una banda débil a 2729.15 cm⁻¹ por absorción molecular de cicloalcanos.

También hay una banda débil a 1637.33 cm⁻¹ debida a una tensión del enlace C=C aislado.

La absorción a 1452.21 cm⁻¹ corresponde a una vibración de flexión de los grupos metileno -CH₂-.

La banda a 1375.18 cm⁻¹ ocasionada por las oscilaciones de los grupos -CH₃, sirve para confirmar grupos metilo, los cuales posiblemente son originados por el gem- dimetil que existe en los componentes de interés, alfa pineno y eucaliptol.

Por último una banda débil, a 1263.96 cm^{-1} de tensión C-O probablemente de alcoholes y éteres.

En la tabla No 8 se resumen las bandas más notables que se observan en el espectro I.R. del patrón eucaliptol. A 2933.22 cm^{-1} hay una banda de absorción por alargamiento carbono-hidrógeno, característica de carbono tetraédrico que en la estructura de eucaliptol corresponde a los carbonos con hibridación Sp^3 .

Otra banda aparece a 1460.53 cm^{-1} la cual es originada por una vibración de flexión carbono-hidrogeno de los grupos metilo situados en los carbonos 7, 9,10 y los grupos metileno en los carbonos 2, 3, 5 y 6.

Las bandas a 1368.08 y 1305.72 cm^{-1} son ocasionadas por el gem-dimetil ubicado en el carbono 8 de la estructura del eucaliptol.

En el I.R. se observan dos bandas intensas a 1167.10 y 1078.78 cm^{-1} debidas a un estiramiento del enlace C-O-C de tipo asimétrico, característica para éteres alifáticos, localizado entre el carbono 1 y el carbono 8 de la estructura de eucaliptol.

Tabla No 8 Información Espectro I.R del estándar eucaliptol.

Banda de absorción I.R. Frecuencia, cm^{-1}	Característica Estructural
2933.22	Tensión asimétrica de metileno C-H
1460.53	Deformación asimétrica de metilo $-\text{CH}_3$
1368.08	Deformación simétrica de metilo $-\text{CH}_3$
1305.72	Deformación de aleteo y de tensión del metileno serie de bandas, solapadas
1167.10	Tensión asimétrica intensa de éteres alifáticos C-O-C
1078.78	Tensión asimétrica intensa de éteres alifáticos C-O-C
1220.62	Tensión de C-O en alcoholes y éteres

Las bandas encontradas en el I.R. de alfa-pineno se muestran en la tabla No 9. Hay una banda de absorción a 2919.88 cm^{-1} , la cual corresponde a una tensión asimétrica de enlace C-H, localizada en la estructura de alfa-pineno en los grupos metileno, (carbonos 3 y 5) y grupos metilo (carbonos 8, 9 y 10).

Una banda débil a 2725.18 cm^{-1} debida a una absorción molecular de cicloalcanos.

Una banda de absorción débil característica a 1657.06 cm^{-1} que se atribuye a una vibración por estiramiento del doble enlace aislado ubicado entre los carbonos 1 y 2 de la molécula de alfa-pineno.

La banda a 1444.57 cm^{-1} es debida a una vibración de flexión de los grupos $\text{-CH}_2\text{-}$ y CH_3 .

La vibración a 1372.26 y 1332.23 cm^{-1} es ocasionada por las oscilaciones de los grupos CH_3 correspondientes al gem-dimetil que hay en el carbono 7 de la estructura de alfa-pineno.

Comparando el espectro infrarrojo de cada uno de los patrones, como son alfa-pineno y eucaliptol con el del aceite esencial de eucalipto, se observan bandas de absorción semejantes, lo cual permite confirmar que en el aceite probablemente se encuentran estos dos componentes.

Tabla No 9 Información Espectro I.R del estándar α - pineno.

Banda de absorción I.R. Frecuencia, cm^{-1}	Característica Estructural
2919.88	Tensión asimétrica de metileno C-H $\text{-CH}_2\text{-}$
2725.18	Absorción molecular de cicloalcanos
1657.06	Estiramiento de grupo C = C débil
1444.57	Deformación asimétrica de metilo -CH_3
1372.26	Flexión simétrica de metilo -CH_3

6.3.2 Análisis por espectroscopía ultravioleta visible. Los aceites esenciales contienen muchos componentes que presentan enlaces insaturados, los cuales originan absorciones útiles en la región ultravioleta mayor a 180 nm.

Se tomó el espectro UV a una solución del aceite esencial de *Eucalyptus grandis* en etanol, a una concentración de 2 ppm en el rango de longitudes de onda comprendido entre 190 y 700 nm. En el espectro obtenido se observa un pico ancho de absorción máxima a 201.8 nm. También se obtuvo un espectro U.V para cada uno de los patrones, es decir α -pineno y eucaliptol en etanol a una concentración de 2 ppm cada uno, observándose en dichos espectros la máxima absorción a 196 y 200 nm respectivamente. (ver anexos E, F,G).

En el espectro UV-VIS del aceite esencial se observa una intensa absorción a 201.8nm y ninguna a mayor longitud de onda lo cual sugiere que en el aceite, solo hay componentes que tienen insaturaciones aisladas o son saturados, esta información es útil para complementar lo observado en el espectro I.R. del aceite^{11, 12}.

6.4 ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO PARA DETERMINAR EUCALIPTOL Y α -PINENO EN EL ACEITE ESENCIAL DEL FOLLAJE DE *Eucalyptus grandis*

6.4.1 Estandarización del método analítico.

6.4.1.1 Optimización de las condiciones cromatográficas. En el proceso de encontrar las condiciones instrumentales óptimas para separar, identificar y cuantificar los metabolitos secundarios α -pineno y eucaliptol en el aceite esencial de eucalipto se tuvieron en cuenta las propiedades físicas y químicas de estas sustancias. Fue así como se eligió trabajar con la columna HP-INNOWAX puesto que la fase estacionaria que la recubre es apropiada para la separación de aceites esenciales esto de acuerdo con estudios de aceites esenciales de eucalipto que se han desarrollado utilizando este tipo de fase estacionaria ⁶.

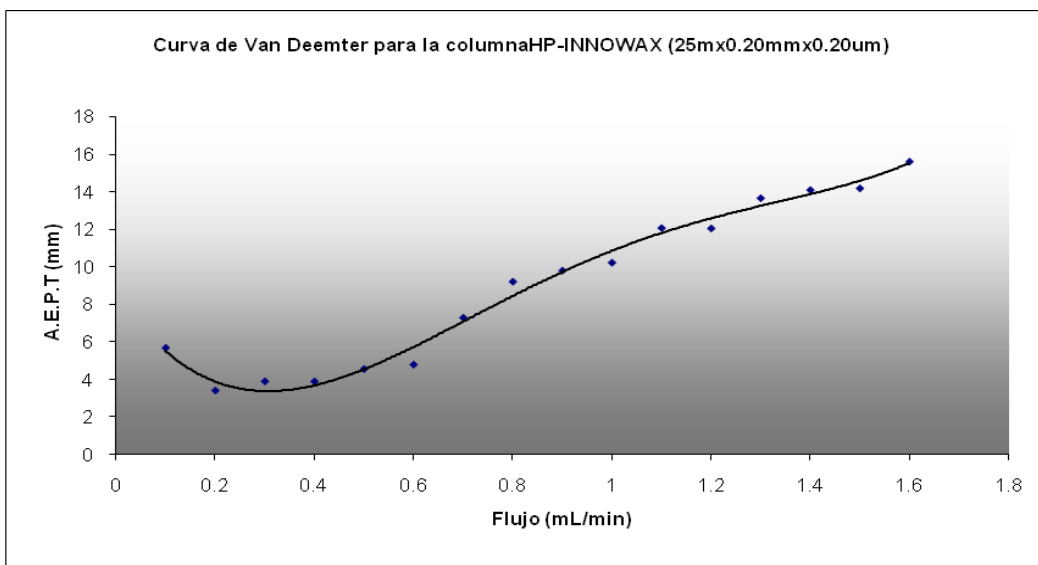
Inicialmente se programaron condiciones instrumentales según las propiedades físicas de los estándares α -pineno y eucaliptol, a continuación se prepararon soluciones de cada componente en etanol que fueron inyectadas empezando por la solución de menor concentración, con el fin de identificar cada componente, mediante su tiempo de retención.

Una vez logrado identificar el α -pineno (3.82 min.) y el eucaliptol (6.90min.) según su tiempo de retención en las condiciones cromatográficas programadas se procedió a inyectar la muestra de aceite esencial de eucalipto, observándose la aparición de las señales para α -pineno y eucaliptol en el mismo t_R , que se determinó para los estándares. De este modo se confirmó que en el aceite existen dichos componentes.

6.4.1.2 Curva Van Deemter para determinación del flujo óptimo en la columna HP-Innowax. Para realizar la curva Van Deemter, se utilizó una solución de α -pineno en etanol, la cual fue inyectada a diferentes flujos de He, cubriendo un rango de 0.1 mL/min hasta 1.6 mL/min, teniendo constantes las demás condiciones cromatográficas (ver tabla No 8).

Observando la figura 1 el flujo optimo con el cual se obtiene la mayor eficiencia en la columna HP-INNOWAX está comprendido entre 0.2 y 0.4 m L /min. Para mayor rapidez del análisis se decidió trabajar con el flujo de 0.4 m L / min .

Figura 1 Curva de Van Deemter para determinar el flujo óptimo en la columna HP-INNOWAX (25m x 0.20mm x 0.20 μ m)



6.4.1.3 Método de cuantificación. El método más común para análisis cromatográfico cuantitativo implica la preparación de una serie de soluciones del analito que cubran el rango de la concentración que se espera aproximadamente para él, en la solución problema. Se corren los cromatogramas y se obtienen gráficas de alturas o áreas de los picos contra concentración. La grafica debe dar una recta que pasa por el origen y el análisis se fundamenta en esta gráfica.

La fuente de error más importante por este método de análisis es la incertidumbre en el volumen de la muestra y a veces la velocidad de inyección. Generalmente las muestras son aproximadamente de un microlitro y la medición de volúmenes de este rango puede tener un error relativo apreciable. Si tenemos en cuenta que en cromatografía de gases la muestra se inyecta en un puerto caliente, la evaporación de la muestra en la aguja de la jeringa puede producir variaciones en volumen inyectado real. Los errores pueden reducirse y hacerse prácticamente despreciables con el uso de un muestreador con inyector automático⁴¹.

La mejor precisión para análisis cromatográfico cuantitativo se basa en el uso de estándares internos porque se eliminan las incertidumbres originadas en la inyección de la muestra. Con éste método se ha obtenido precisión hasta del 0.5 %⁴¹.

El método de patrón interno se intento utilizar en la cuantificación de los componentes alfa-pineno y eucaliptol en el aceite esencial de *Eucalyptus grandis*. Con este fin se ensayaron los estándares α -terpineol y citronelol pero se encontraron en la muestra de aceite esencial. Esto se presenta en los siguientes cromatogramas, en el primero se inyectó una mezcla de los estándares α -

pineno, eucaliptol y α -terpineol que se identificaron con tiempos de retención de 3.75 , 5.70 y 7.89 minutos respectivamente, como se observa en las figuras 2 y 3 y en el segundo cromatograma que corresponde a la muestra de aceite esencial de eucalipto se pueden apreciar los mismos picos que se identificaron por los mismos tiempos de retención, lo cual confirma que en el aceite se encuentran estos tres componentes. En el caso del patrón citronelol, se identificó por el tiempo de retención de 9.12 minutos. Cuando se inyectó una solución del aceite apareció un pico en el mismo tiempo de retención que el del estándar, por tanto también en el aceite hay citronelol, lo cual se observa en las figuras 4 y 5.

Los estándares que se iban a utilizar como patrón interno no cumplieron con los requisitos para utilizar este método, por tanto se decidió hacer la cuantificación por el método de estándar externo, que como se mencionó antes, es el más común para análisis cromatográfico cuantitativo⁴¹.

Figura 2 Cromatograma de los patrones α -pineno, eucaliptol y α -terpineol disueltos en etanol.

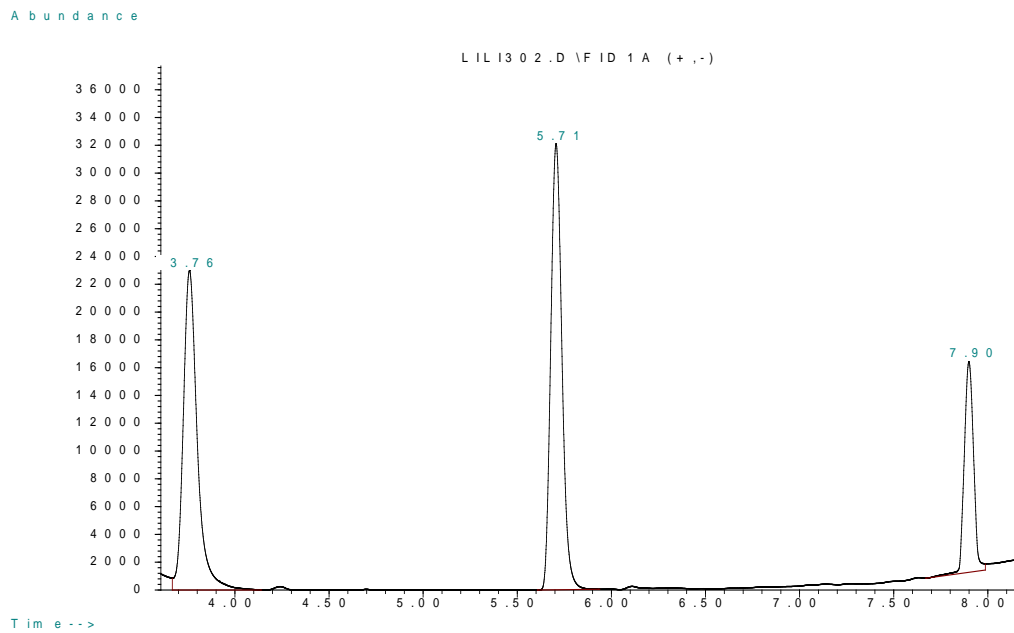


Figura 3 Cromatograma de la muestra de aceite esencial de eucalipto disuelta en etanol (100 ppm).

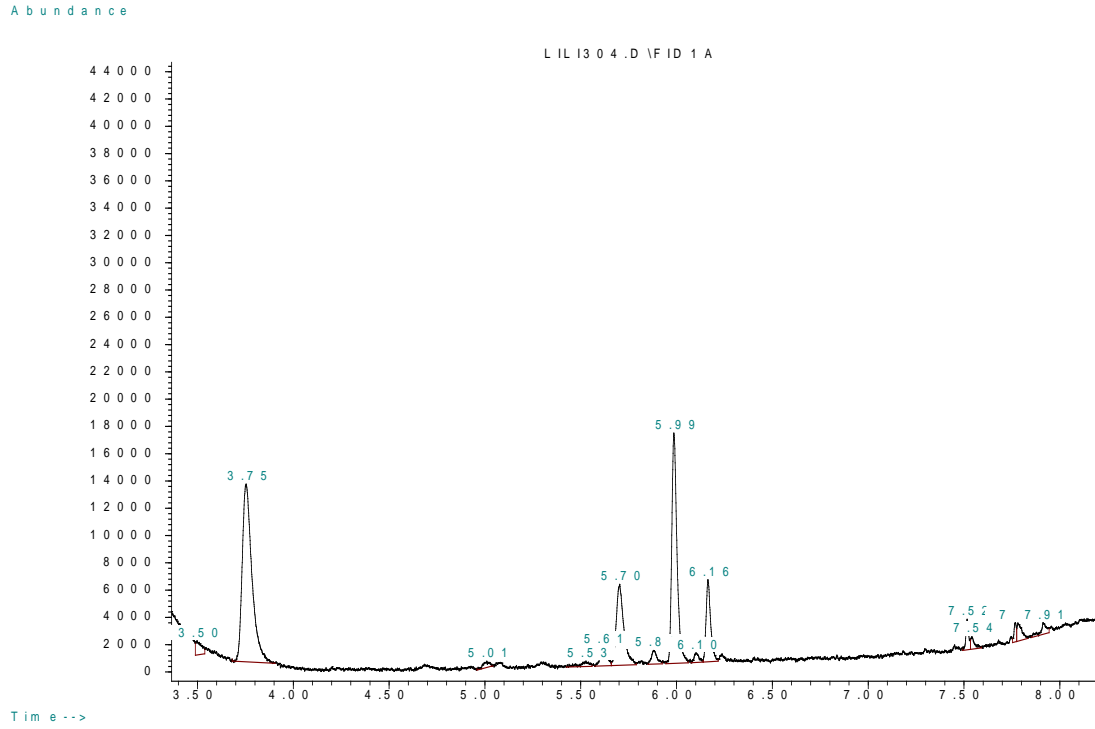


Figura 4 Cromatograma de aceite esencial de eucalipto disuelto en etanol (200 ppm)

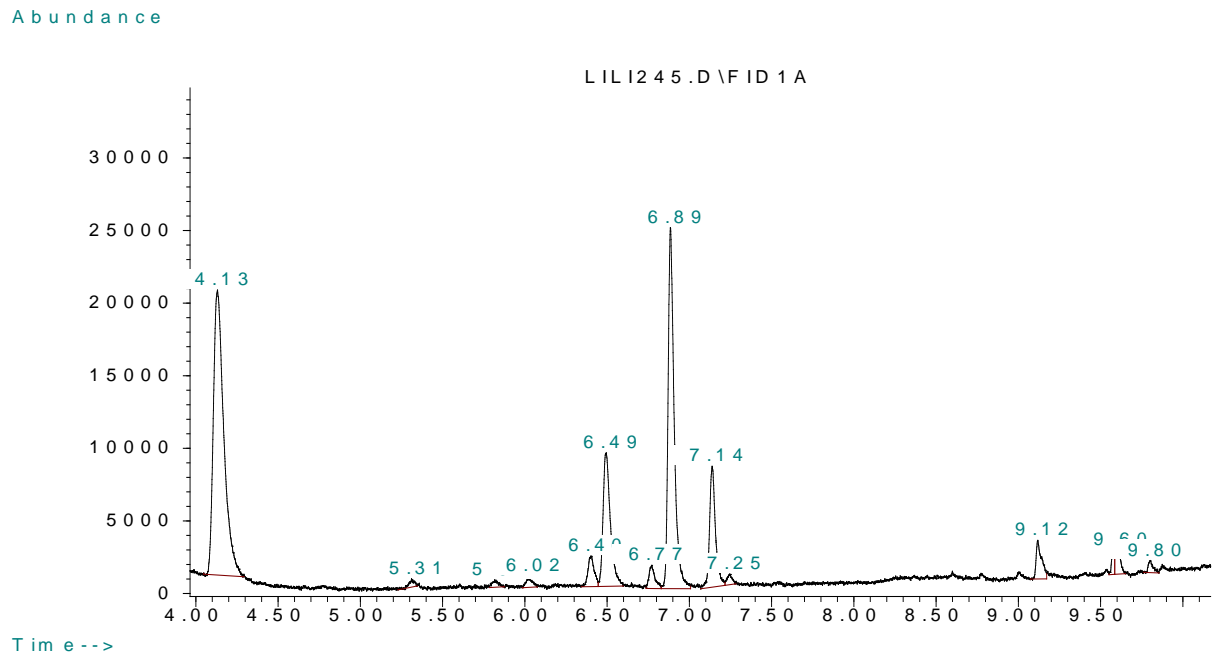
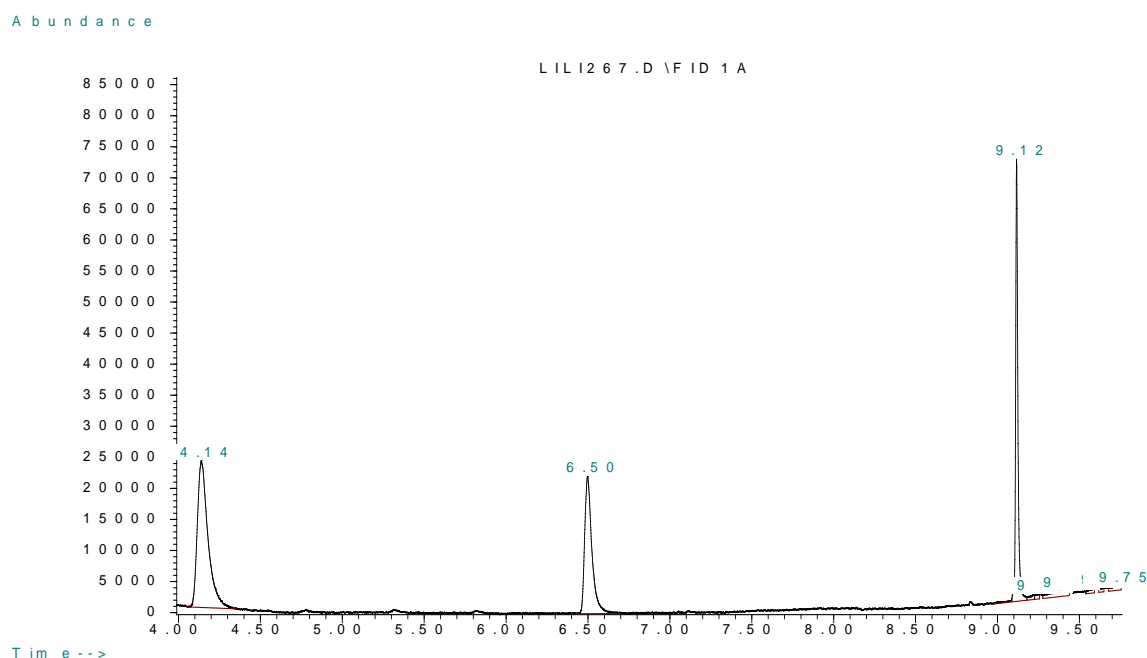


Figura 5 Cromatograma de los estándares α -pineno , eucaliptol y citronelol



6.4.1.4 Condiciones instrumentales para el análisis de los metabolitos secundarios α -pineno y eucaliptol en el aceite esencial de eucalipto. De acuerdo con el procedimiento de identificación de α -pineno y eucaliptol y teniendo en cuenta las propiedades fisicoquímicas, tanto de los estándares α -pineno y eucaliptol como del aceite esencial se establecieron las condiciones, cromatográficas tales como las temperaturas del inyector, el horno y el detector y mediante la curva de Van Deemter (Figura1). Se determinó el flujo óptimo del gas portador He en la columna HP – INNOWAX. Las condiciones cromatográficas en las que se hará el análisis se presentan en la tabla No10.

Tabla No 10 Parámetros instrumentales para análisis de α -pineno y eucaliptol en el aceite esencial de eucalipto.

Parámetro	Valor determinado
Temperatura inyector °C	220
Temperatura horno °C	Rampa. 60°C 3.1 min hasta 100°C (8°C/min), 100 °C (25 °C/min) hasta 210 °C.
Temperatura detector °C	280
Flujo optimo He mL/min	0.4mL/min
split	100 : 1

Figura 6 Cromatograma de los estándares α -pineno y eucaliptol disueltos en etanol en las condiciones en las que se hará el análisis

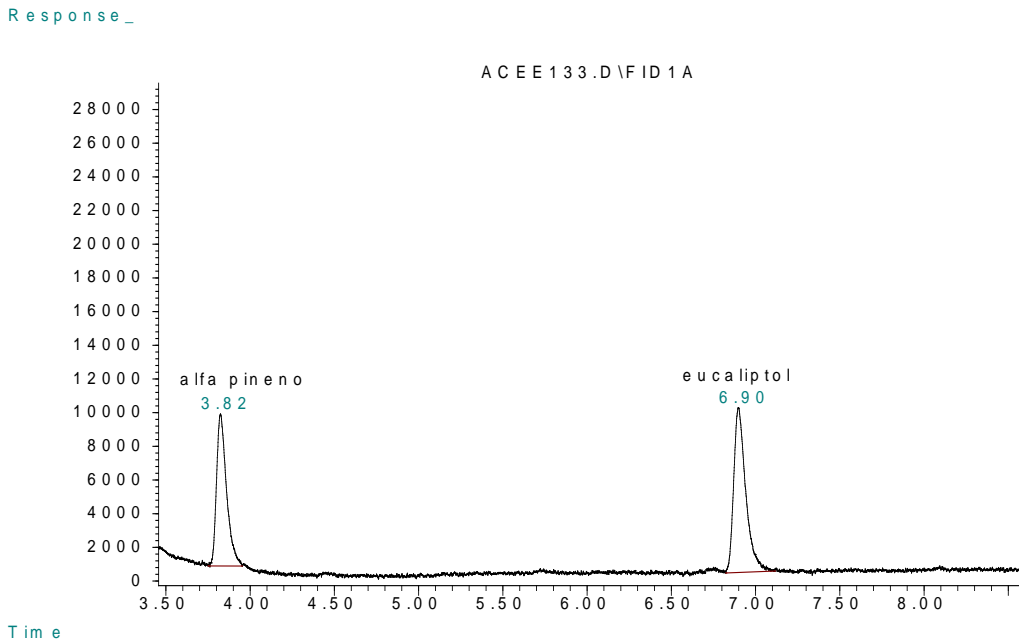
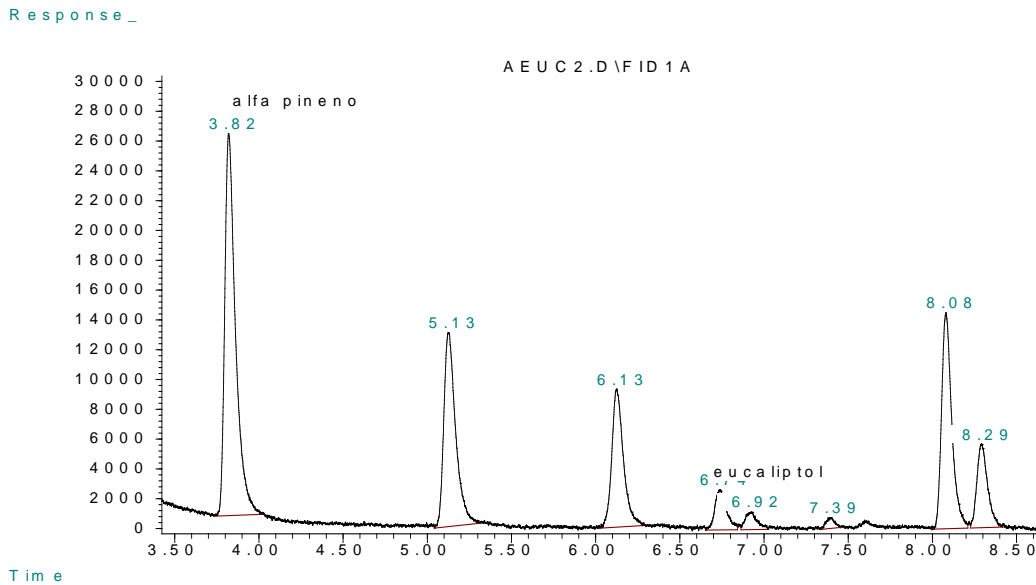


Figura 7 Cromatograma de la muestra de aceite esencial de eucalipto en las condiciones en las que se hará el análisis



6.5 DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

6.5.1 Linealidad. Para determinar la linealidad del método en la cuantificación de α -pineno se realizaron dos curvas de calibración. Las curvas se hicieron en

los rangos de 3 a 13 ppm (figura 8) y de 13 a 60 ppm (figura 9) obteniéndose coeficientes de correlación al cuadrado de 0.9967 y 0.9946 respectivamente.

Figura 8 Curva de calibración de α -pineno en el rango de concentraciones de 3 hasta 13 ppm

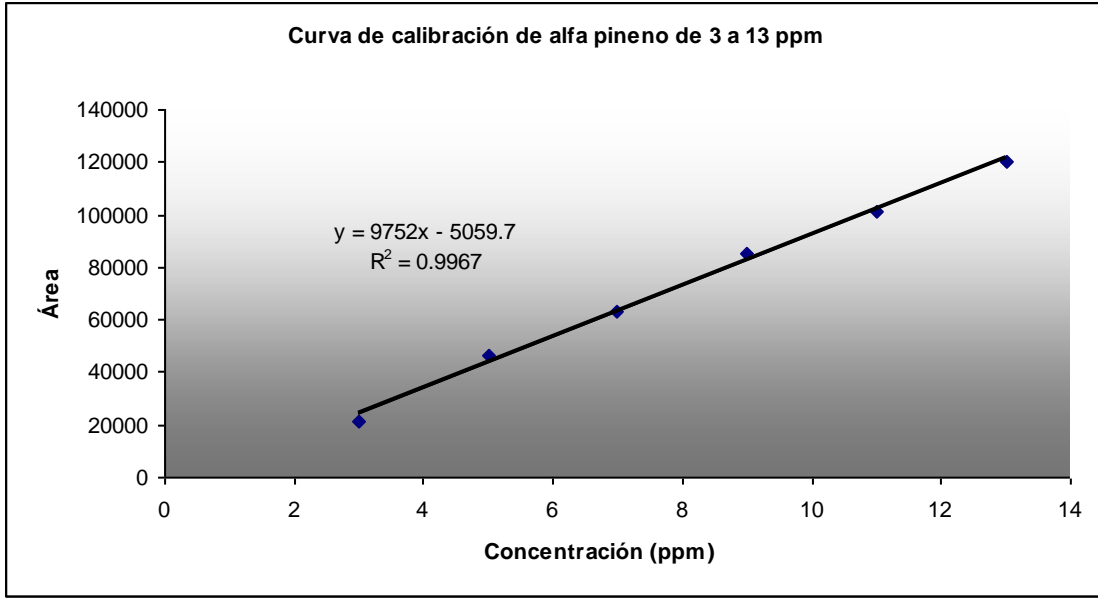
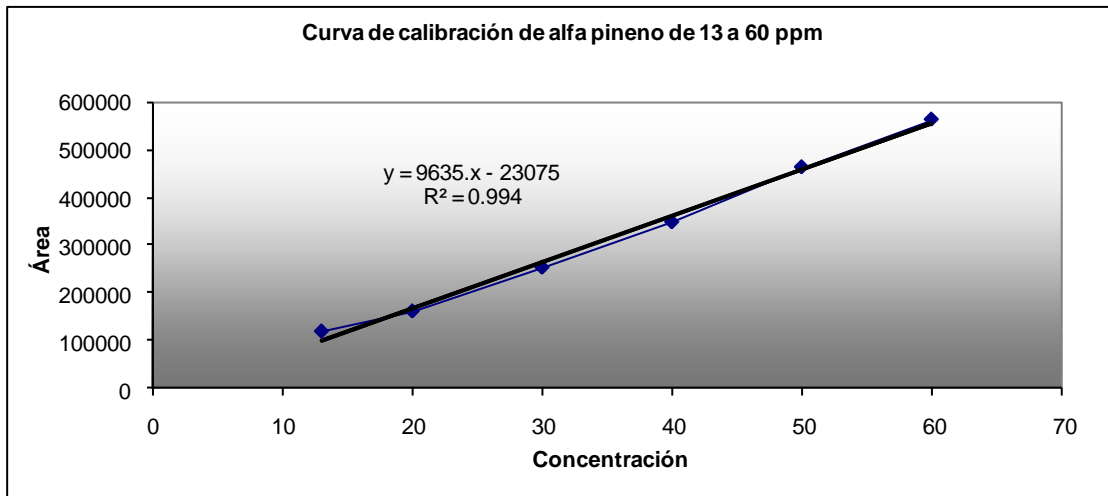
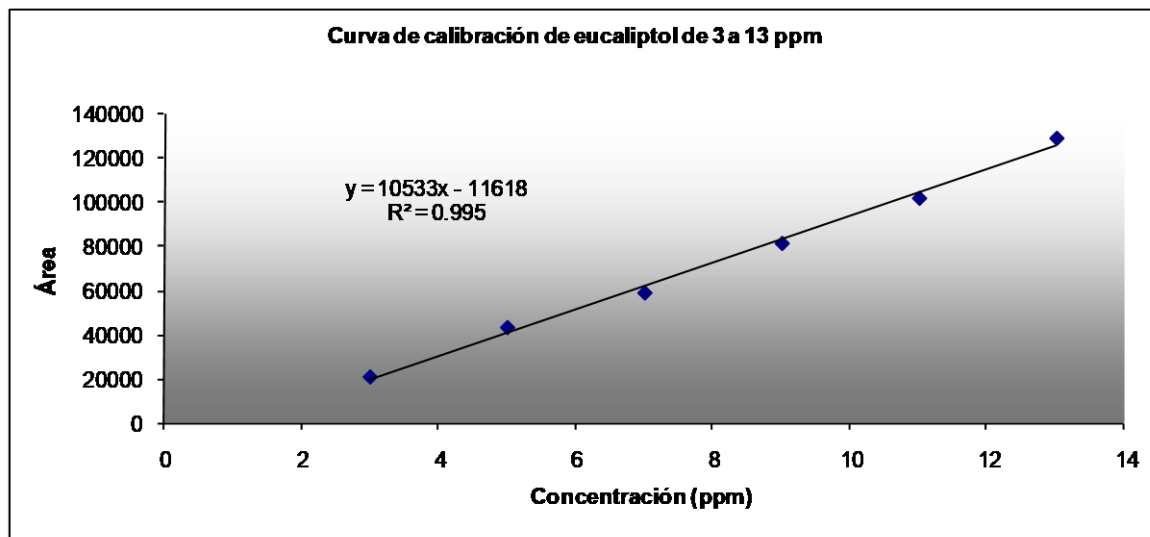


Figura 9 Curva de calibración de α -pineno en el rango de concentraciones de 13 hasta 60 ppm



Para el estándar eucaliptol se hizo una curva de calibración comprendida en el rango de 3 a 13 ppm y su respectivo coeficiente de correlación al cuadrado fue de: 0.9951, como se observa en la figura 10.

Figura 10 Curva de calibración de eucaliptol en el rango de concentraciones de 3 hasta 13 ppm



Los coeficientes de correlación al cuadrado de las tres curvas de calibración confirman la linealidad, y por consiguiente demuestran que hay una relación directamente proporcional entre la concentración de cada uno de los estándares (alfa pineno y eucaliptol) con la respuesta del instrumento.

6.5.2 Sensibilidad

6.5.2.1 Límite de detección y límite de cuantificación. Para determinar los límites de detección y cuantificación de los dos analitos α -pineno y eucaliptol, se hizo para cada uno, una curva de calibración, cuyo rango de concentraciones estuvo comprendido entre 3 y 13 ppm para α -pineno y 3 y 13 ppm para eucaliptol.

Se analizó cada cromatograma obtenido en el rango de concentraciones de las curvas, para estimar en forma experimental la concentración en el límite de detección y de cuantificación de cada analito. Se encontró, aproximadamente la concentración en el límite de detección y de cuantificación para α -pineno, en la cual se estableció que la señal supera la relación señal/ruido en un factor de 3 para el límite de detección y de 10 para el límite de cuantificación^{35, 36}. También se calcularon teóricamente estos parámetros aplicando las ecuaciones (1) y (2) como se muestra en la tabla No11, para α -pineno.

Tabla No11 Limite de detección y limite de cuantificación de α -pineno

Analito	Desviación estándar de la ordenada en el origen (Sbl)	Valor corte ordenada (Yb)	Valores Y		Límite de detección (ppm)	Límite de cuantificación (ppm)
			Límite de detección	Límite de cuantificación		
α -pineno	2429	5059	2227	19230	0.747	2.491

Igualmente se hizo un análisis para el estándar eucaliptol en el rango de concentraciones de 3 a 13 ppm, donde se determinó para cada concentración la relación señal/ruido. Los valores teóricos del límite de detección y el límite de cuantificación se calcularon con las ecuaciones (1) y (2) respectivamente y se presentan en la tabla No 12.

Tabla No12 Limite de detección y limite de cuantificación de eucaliptol

Analito	Desviación estándar de la ordenada en el origen (Sbl)	Valor corte ordenada (Yb)	Valores Y		Límite de detección (ppm)	Límite de cuantificación (ppm)
			Límite de detección	Límite de cuantificación		
eucaliptol	3223	-11618	1948	20616	0.918	3.060

El límite de detección determinado experimentalmente para α -pineno y eucaliptol corresponde a una concentración de 0.7 ppm y 0.9 ppm respectivamente, esto significa que a concentraciones menores la señal de cada analito se confunde con la señal del ruido.

6.5.3 Precisión

6.5.3.1 Repetitividad

La repetitividad del método se evaluó para el triplicado de cada concentración comprendida en los dos rangos de las dos curvas de calibración que se hicieron para el patrón α -pineno.

En las tablas 13 y 14 se presentan los resultados calculados para la desviación estándar y la desviación estándar relativa de las curvas de 3 a 13 ppm y de 13 a 60 ppm.

En la curva de calibración de α -pineno de 3 a 13 ppm el valor de la desviación estándar relativa (RSD) para este rango de concentraciones es menor del 5 %,

por lo tanto el método es repetitivo para concentraciones bajas de estándar cercanas al límite de detección.

Para la curva de calibración de α -pineno de 13 a 60 ppm el valor para la desviación estándar relativa varía entre 0.415 y 1.551 % por lo tanto se puede decir que el método es repetitivo para este rango de concentraciones.

Tabla No 13. Datos de las áreas y sus respectivas desviaciones estándar de la curva de calibración de α -pineno en el rango de concentraciones de 3 – 13 ppm

Concentración (ppm)	Área 1	Área 2	Área 3	Área promedio	S	RSD
3	21891	21557	20748	21398	587.719	2.747
5	45064	46504	47051	46206	1026.399	2.221
7	61906	64477	63329	63237	1287.949	2.037
9	84867	85077	85188	85044	163.025	0.192
11	100803	103342	100087	101410	1710.468	1.687
13	120745	119869	120713	120442	499.289	0.415

Tabla No 14. Datos de las áreas y sus respectivas desviaciones estándar de la curva de calibración de α -pineno en el rango de concentraciones de 13 – 60 ppm

Concentración (ppm)	Área 1	Área 2	Área 3	Área promedio	S	RSD
13	120745	119869	120713	120442	499.289	0.415
20	161118	163249	163076	162481	1183.558	0.728
30	255437	250049	256532	254006	3470.323	1.366
40	352317	351960	342765	349014	5414.736	1.551
50	460244	460527	471619	464130	6487.208	1.398
60	562971	562590	565958	563839	1844.395	0.327

En la tabla No 15. Se presenta los resultados de desviación estándar (S) y desviación estándar relativa (RSD) para la curva patrón de eucaliptol en el rango de 3 a 13 ppm. Los porcentajes de desviación estándar relativa oscilan entre 0.95 y 3.37 %, estos valores demuestran que hay una aceptable repetitividad del método para concentraciones próximas al límite de detección de eucaliptol.

Tabla 15. Datos de las áreas y sus respectivas desviaciones estándar de la curva de calibración de eucaliptol en el rango de concentraciones de 3 – 13 ppm.

Concentración (ppm)	Área 1	Área 2	Área 3	Área promedio	S	RSD
3	21009	20569	21681	21086	560.019	2.656
5	43796	41803	44656	43418	1463.515	3.371
7	60093	57397	59683	59057	1452.717	2.459
9	82612	79511	82223	81448	1689.303	2.074
11	102383	102498	100722	101867	993.841	0.976
13	129315	127644	130045	129001	1230.849	0.954

6.5.3.2 Reproducibilidad. La reproducibilidad del método se realizó en tres días diferentes inyectando la misma concentración de cada estándar por triplicado. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla No16, para α -pineno y en la tabla 17 para eucaliptol, donde se aprecia que el método es reproducible para los dos estándares, ya que, los valores de la desviación estándar relativa son menores del 5 %.

Tabla No16 Datos para la evaluación de reproducibilidad de la curva de calibración de α -pineno de 13 a 60 ppm

Concentración (ppm)	Área 1	Área 2	Área 3	Área promedio	S	RSD
60	565440	558802	565229	563157	3773.016	0.669
60	541518	549483	552783	547928	5791.249	1.057
60	555899	554201	553281	554460	1328.127	0.239

Tabla No17 Datos para la evaluación de reproducibilidad de la curva de calibración de eucaliptol de 3 a 13 ppm

Concentración (ppm)	Área 1	Área 2	Área 3	Área promedio	S	RSD
9	80782	82729	81197	81569	1025.513	1.257
9	84080	84076	83356	83837	416.852	0.497
9	79296	81609	81353	80753	1267.988	1.570

6.5.4 Exactitud. Se calcularon los porcentajes de recuperación de tres concentraciones (20, 40 y 60 ppm) de la curva de calibración de α - pineno que fueron inyectadas por triplicado. Con los porcentajes se determinó la

recuperación media (R) para n= 9 medidas y con la ecuación No.5 se calculó el t experimental, t_{obt} , obteniéndose un valor de 2.101, el cual se comparó con el t de tablas para 8 grados de libertad a un nivel de confianza del 95 % que es de 2.306. Como el t_{obt} es menor que el valor tabulado, el método es exacto al nivel de confianza escogido. Ver tabla No 18.

$$t_{obt} = (100 - R) n^{1/2} / RSD \quad (5)$$

Tabla No18 Datos para determinar el t student y calcular el porcentaje de recuperación de estándares de α - pineno en la curva de calibración (13-60 ppm)

Concentración (ppm)	Áreas	Concentración obtenida (ppm)	% Recuperación
30	255437	28.9048	96.3492
	250049	28.3456	94.4853
	256532	29.0184	96.7280
40	352317	38.9593	97.3981
	351960	38.9222	97.3055
	342765	37.9679	94.9198
60	562971	101.3692	101.3692
	562590	101.3033	101.3033
	565958	101.8859	101.8859
R (n=9): 97.972 %	S: 2.837	RSD:2.896	$t_{tab} = 2.306$ para 95 % $t_{obt} = 2.101$

Para determinar la exactitud de la curva de calibración de eucaliptol en el rango de concentraciones de 3 a 13 ppm se tomaron los datos de áreas de las concentraciones de 7, 11 y 13 ppm, obtenidas por triplicado (ver tabla No 19), se siguió el mismo procedimiento que para el estándar α - pineno y se halló un t experimental de 1.065 el cual es menor que el t de tabla para 8 grados de libertad, por tanto el método es exacto al nivel de confianza escogido.

Tabla No 19 Datos para determinar el t student y calcular el porcentaje de recuperación de estándares de eucaliptol en la curva de calibración (3 -13 ppm)

Concentración (ppm)	Áreas	Concentración obtenida (ppm)	% Recuperación
7	60093	6.8082	97.2602
	57397	6.5523	93.6037
	59683	6.7693	96.7041
11	102383	10.8232	98.3927
	102498	10.8341	98.4919
	100722	10.6655	96.9591
13	129315	13.3801	102.9239
	127644	13.2215	101.7036
	130045	13.4494	103.4570
R (n=9): 98.833 %	S: 3.251	RSD:3.289	$t_{tab} = 2.306$ para 95 % $t_{obt} = 1.065$

6.5.5 Cuantificación de α - pineno y eucaliptol en las muestras de aceite esencial de eucalipto.

La cuantificación de α - pineno en las muestras de aceite esencial de eucalipto se realizó mediante el método de curva patrón. Para ello se hizo una curva de 13 a 60 ppm del estándar α - pineno diluido en etanol, luego de haber encontrado que la concentración de este componente en las muestras estaba comprendida dentro de este rango.

Para calcular la concentración de α - pineno en cada una de las muestras de aceite esencial de eucalipto se midió por triplicado una solución de aceite en etanol de 150 ppm, la cual a su vez fue preparada por dilución de 11.2 μ L de aceite puro en etanol hasta completar un volumen de 5 mL. Con el área promedio calculada para cada muestra se reemplazó en la ecuación de la línea recta de la curva de calibración ($y = mx + b$), de donde se despejó x para hallar la concentración de α - pineno en la muestra problema de aceite de eucalipto, después por factores de dilución y con la densidad del aceite se determinó el porcentaje de α - pineno en el aceite puro.

La cuantificación de α -pineno en las muestras de aceite esencial de eucalipto se realizó de acuerdo al tiempo de recolectado el follaje hasta la extracción del aceite, para los días 1, 2, 3, 4, 5, 10 y 16, como se muestra en la tabla No 20.

Tabla No20 Concentración de α - pineno en la muestra de aceite esencial de eucalipto de acuerdo con el tiempo de recolectada la muestra.

Día	Área promedio	Concentración α - pineno en muestra de aceite de 150 ppm	% α - pineno en la muestra de aceite extraída
1	292321	32.733	21.823
2	265497	29.949	19.967
3	262406	29.628	19.753
4	210576	24.249	16.167
5	212339	24.432	16.289
10	148768	17.834	11.890
16	126762	15.550	10.368

Se evaluó el contenido expresado en porcentaje de α -pineno en las muestras de aceite esencial de eucalipto, obtenidas durante los días 1, 2, 3, 4 , 5, 10 y 16 posteriores a la recolección del follaje, para determinar el comportamiento de este componente según el tiempo de secado de la muestra. Se observó que los porcentajes de α -pineno en las muestras de aceite para los días uno hasta el día cinco disminuyen ligeramente, lo cual no ocurre para los días 10 y 16 , donde se da una disminución notable del porcentaje de α -pineno comparado con las muestras obtenidas durante los cinco primeros días , la disminución podría deberse a las condiciones ambientales del lugar donde ha sido almacenada la muestra.

También se identificó el metabolito secundario eucaliptol en la muestra de aceite esencial de eucalipto el cual presentó un tiempo de retención de 6.92 min en las condiciones cromatográficas en las que fue analizada la muestra.

Se hizo el mismo análisis que con el componente α -pineno para los diferentes días de extracción antes mencionados, pero no se obtuvieron datos concretos del contenido de eucaliptol en la muestra de aceite esencial, para los días siguientes al primer día de extracción.

Se analizó por cromatografía de gases la muestra obtenida el primer día de extracción en la cual se pudo cuantificar eucaliptol con la curva realizada en el rango de 3 a 13 ppm, pero fue necesario preparar una solución muy concentrada del aceite en etanol (600 ppm). De igual forma se continuó inyectando soluciones del aceite obtenido los días 2, 3, 4 , 5, 10 y 16 , pero no se pudo cuantificar eucaliptol en estas muestras, pues su concentración es mínima y puede detectarse, mas no cuantificarse, ver tabla No 21.

Tabla No21 Concentración de eucaliptol en la muestra de aceite esencial de eucalipto de acuerdo con el tiempo de recolectada la muestra.

Día	Áreas	Área promedio	S	RSD	Concentración eucaliptol en muestra de aceite de 600 ppm	% eucaliptol en la muestra de aceite extraída
1	71834 69164 71804	70934	1533	2.1611	8.179	1.363
1	35729 34788 37678	36065	1474	4.0871	4.635	0.773
1	43688 42347 41778	42604	981	2.3018	5.148	0.858

7. CONCLUSIONES

- Se estandarizó el método para identificar y cuantificar α -pineno en el aceite esencial de *Eucalyptus grandis*, el cual es estadísticamente confiable.
- En el aceite esencial de *Eucalyptus grandis* se identificó y cuantificó el metabolito secundario α -pineno, empleando la técnica de cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG-FID).
- El α -pineno es uno de los componentes del aceite esencial de eucalipto que se encuentra en mayor proporción.
- Se aplicó el protocolo de estandarización que permitió estimar la exactitud, precisión, linealidad y sensibilidad para el método analítico empleado en la identificación y cuantificación de α -pineno y eucaliptol en el aceite esencial obtenido del follaje de la especie *Eucalyptus grandis*.
- El análisis estadístico de los diferentes parámetros de calidad evaluados para identificar y cuantificar α -pineno y eucaliptol en el aceite esencial de *Eucalyptus grandis*, los cuales son linealidad, sensibilidad, precisión y exactitud, están dentro de los valores aceptados para catalogar el método analítico como estadísticamente confiable.
- Se logró optimizar las condiciones cromatográficas para separar, identificar y cuantificar dos terpenos en el aceite esencial de la especie *Eucalyptus grandis*.
- En esta investigación se identificó además de los componentes principales de estudio (α -pineno y eucaliptol) la presencia de citronelol y α -terpineol en el aceite esencial extraído del follaje de la especie *Eucalyptus grandis* cultivado en la vereda La Claridad, propiedad de la empresa Cartón de Colombia.
- El rendimiento de aceite esencial de eucalipto que se determinó para los días 3 hasta el día 20 de haber sido recolectado el follaje estuvo entre 0.656% y 1.445%.
- La evaluación de las constantes físicas como densidad, índice de refracción y punto de volatilización dieron datos que se encuentran

dentro de los rangos establecidos, que han sido reportados en la literatura para los aceites esenciales en general y particularmente para los aceites obtenidos a partir de las diferentes especies de *Eucalyptus*. Demostrándose con ello la pureza y calidad del aceite esencial de *Eucalyptus grandis*.

- Con base en los porcentajes de α -pineno obtenidos en el aceite esencial teniendo en cuenta los días transcurridos desde la recolección de la muestra hasta su extracción se observó que la mayor cantidad de α -pineno aparece en los cinco primeros días posteriores a la recolección del follaje.
- El eucaliptol fue detectado en el aceite esencial obtenido del follaje de la especie *Eucalyptus grandis* , pero a diferencia de la mayoría de especies del género *Eucalyptus* , éste no es el componente más abundante en este aceite, pues en otras especies se ha determinado que la concentración de eucaliptol es aproximadamente el 70% del total del aceite el cual también ha sido cuantificado por cromatografía de gases

8. RECOMENDACIONES

- Se recomienda profundizar en el estudio del aceite esencial de la especie *Eucalyptus grandis*, utilizando otras técnicas de caracterización como la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear.
- El alfa-pineno es uno de los componentes mayoritarios del aceite esencial de *Eucalyptus grandis*, que podría ser aislado para utilizarlo en la síntesis de canfeno, un terpeno de mucha aplicación en la industria farmacéutica.

BIBLIOGRAFÍA

1. MORENO Paula A. Caracterización del follaje de *Eucalyptus grandis*, *Pinus patula*, *Pinus oocarpa* como materias primas para la extracción de aceites esenciales. Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Enero de 2004.
2. STASHENKO, E.E., JARAMILLO, B.E. & MARTINEZ J.R. Comparación de la Composición Química y de la actividad Antioxidante in Vitro de los Metabolitos secundarios Volátiles de Plantas de la Familia Verbenacea. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 2003. Páginas: 579-597
3. BARANSKA M., SCHULZ H., REITZENSTEIN S., et al. Vibrational Spectroscopic Studies to Acquire a Quality Control Method of *Eucalyptus* Essential Oils. Biopolymers, Vol.78, 237-248 (2005) Wiley Periodicals, Inc. (www.interscience.wiley.com).
4. RODRÍGUEZ Paula, SIERRA Wilson. et al. Biotransformation of 1,8-cineole, the main product of *Eucalyptus* oils. Electronic Journal of Biotechnology. Vol.9 No 3. (2006). Pontificia Universidad Católica de Valparaiso (Chile). Páginas:232-236.
5. ROJAS ZAMBRANA J.C. Obtención de Canfeno de Alfa-pineno Sobre Catalizadores Basados en Silicio y Aluminio. Tesis de licenciatura. Universidad Mayor de San Simón, Centro de Tecnología Agroindustrial. Cochabamba-Bolivia, 1999.
6. RICKER Martin ,DALY Douglas C. Botánica Económica en Bosques Tropicales (Principios y Metodo para su Estudio y Aprovechamiento) Editorial Diana. México, D.F. , 1998 Página 144.
7. MARRIOTT Philip J, SHELLIE Robert y CORNWELL Charles. Gas Chromatographic Technologies for the Analysis of Essential Oils (Review) Journal of Chromatography A, 936 Australia 2001. Páginas: 1-22.
8. ALDANA MÉNDEZ Fabio A. La Biomasa una Fuente Alternativa de Energía. Revista Innovación y Ciencia, volumen III-Nº 4. Santafé de Bogotá, Colombia 1994. Páginas: 25-29.
9. RAMEZANI H, SING. H. P., BATISH D. R., KOHLI R.K. and DARGAN J.S. Fungicidal Effect of Volatile Oils from *Eucalyptus citriodora* and its Major Constituent Citronellal. The New Zeland Plant Protection Society Incorporated 55, 2002. Páginas: 327-330.

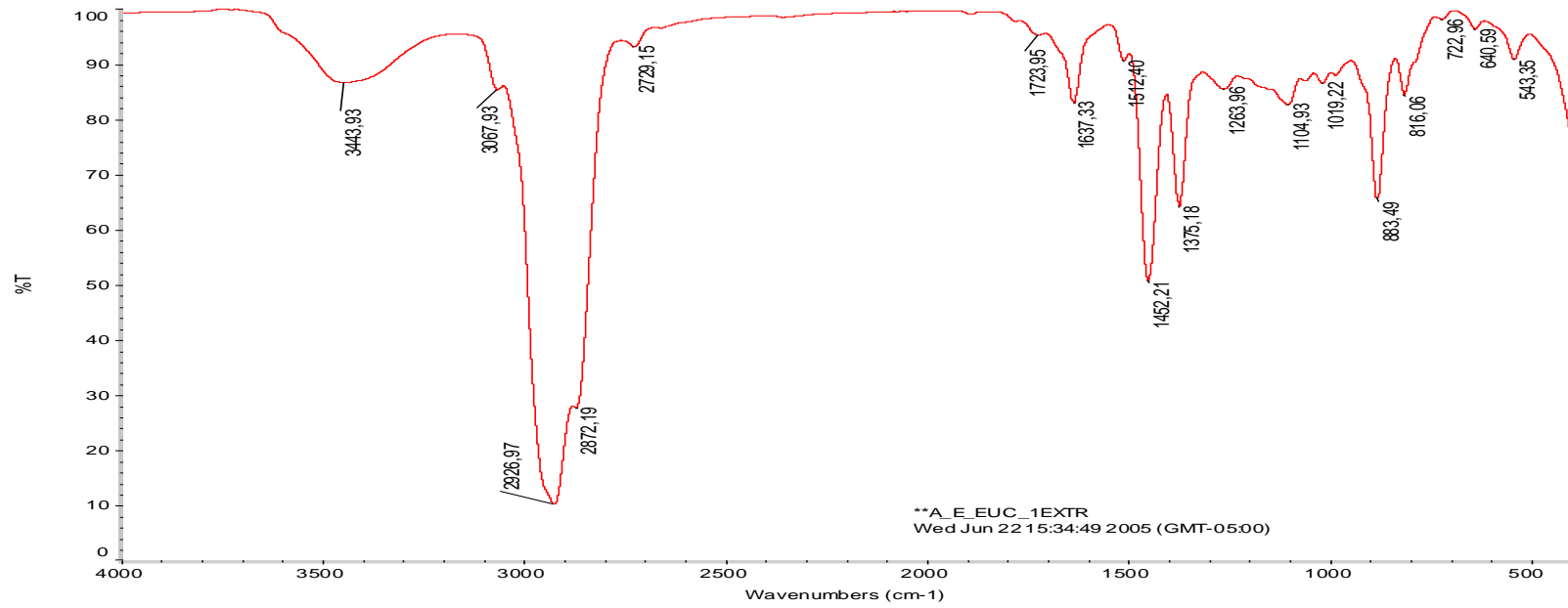
10. OLAYA F. Julia María y MÉNDEZ A. Jacobo. Guía de Plantas y Productos Medicinales. Convenio Andrés Bello. Bogotá 2003. Páginas: 17-21.
11. DOMINGUEZ Xorge A. Métodos de Investigación Fitoquímica. Editorial Limusa, S.A., México 1973. Páginas: 229-237.
12. MARTÍNEZ M. Alejandro. Aceites Esenciales. Universidad de Antioquia. Facultad Química Farmacéutica. Medellín, Febrero 2003. Muiscas.udea.edu.co/~ff/esencias2001b.pdf.
13. GHENTHER Ernest PH. D. The Essential Oils Volumen ONE. D Van NOSTRAND COMPANY, Inc. United States of America 1948. Páginas: 236-256,294-298.
14. GUERRA, C., MECCIA, G., KHOURI, N., ROJAS, L. Estudio comparativo de los aceites esenciales de *Callistemon speciosus* DC. Recolectado en los Estados Carabobo, Lara y Mérida (Venezuela). Revista de la Facultad de Farmacia Vol. 45 (2), Venezuela 2003.
15. IKAN Raphael. Natural Products a Laboratory Guide Second Edition Academic Press, inc. San Diego, California (United States of America) 1991. Páginas: 168-175.
16. KIRK, Raymond y OTHMER, Donald. Enciclopedia de tecnología química. UTEHA Tomo I. México 1961. Página: 65.
17. GARCÍA Dolores, ALVAREZ A., TORNOS P, FERNANDEZ A. Gas Chromatographic-Mass Spectrometry Study of the Essential Oils of *Pimenta racemosa* var. *terebinthina* and *P. racemosa* var. *grisea*. Z. Naturforsch. Enero 2002. Páginas: 449-451
18. KRAUZE Mirosława, MARDAROWICZ M. WIWART M. Antifungal Activity of the Essential Oils from Some Species of the Genus *Pinus* Z.Naturforsch.Enero 2002. Páginas: 478-482.
19. QUINTERO CHACÓN América, GONZÁLEZ DE COLMENARES Nélida y STASCHENKO Elena . Aceite Esencial de las Hojas de *Hyptis umbrosa* Salzm Extraído por Diferentes Técnicas. Acta Científica Venezolana, 55. (2004). Páginas: 181-187
20. MURILLO PEREA Elizabeth y VIÑA PATIÑO Amparo. Determinación De Constituyentes Volátiles De La Albahaca (*Ocimum* spp) Mediante Dos Métodos De Extracción. Revista Colombiana de Química volumen 28, No 1 de 1999.

21. NAM-Sun Kim, DONG-Sun Lee. Comparison of different extraction methods for the analysis of fragrances from *Lavandula* species by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 982 South Korea 2002. Páginas: 31–47.
22. COLMENARES D. Ana Julia, RAMIRCEZ B. Arnoldo. Treinta Plantas Medicinales del Valle del Cauca. Impresora Feriva S.A. Cali, Colombia 2004. Páginas: 33-35
23. GARCIA BARRIGA Hernando. Flora Medicinal de Colombia Botánica médica., segunda edición, Tercer Mundo Editores. Tomo II. Bogotá, Colombia. 1992. Páginas: 297-301
24. ODY Penelope The Herb Society Las Plantas Medicinales. Javier Vergara Editor S.A. Cuarta edición. Italia 1997. Página 56.
25. OGUNWANDE, Isiaka A. Chemical composition of the essential oils from the leaves of three *Eucalyptus* species growing in Nigeria. (02 de marzo de 2005). *Journal of Essential Oil Research: JEOR*, Sep/Oct 2003. <http://www.findarticles.com/p/articles/mi-qa4091/is-200309/ai-n9288724>
26. DAVID Frank. Analysis of Essential Oil Compounds Using Retention Time Locked Methods and Retention Time Databases. USA 2002. www.Agilent.com/chem.
27. SKOOG, Douglas. HOLLER, F. James. Principios de análisis instrumental. Quinta edición. McGraw-HILL. España, 2001, Pág. 707-711, 753-754.
28. SKOOG, Douglas. HOLLER, F. James. WEST, Donald. Química Analítica. sexta edición. McGraw-HILL. Colombia, 1999, Páginas: 490, 509, 514-516.
29. VALCÁRCEL CASES M., GOMEZ A. Técnicas Analíticas de Separación. Editorial Reverté, S.A. Barcelona (España) 1994. Páginas: 333, 615-619, 631-632.
30. SILVEIRA VITTI Andréa , BRITO Octávio J. Oleo Essencial de Eucalipto. Documentos florestais, No 17. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidad de Sao Paulo. Agosto de 2003. Páginas:1-26.
31. FURNISS Brian S. , HANNAFORD Antony J. , SMITH Peter W. , TATCHELL Austin. VOGEL*s , Textbook of Practical Organic Chemistry , fifth edition , Longman scientific & technical , New York (United States), 1989. Páginas:241-242.
32. FUSON C. Reynold. Identificación Sistemática de Compuestos Orgánicos; Limusa editores, México, 1995. Páginas: 46-54

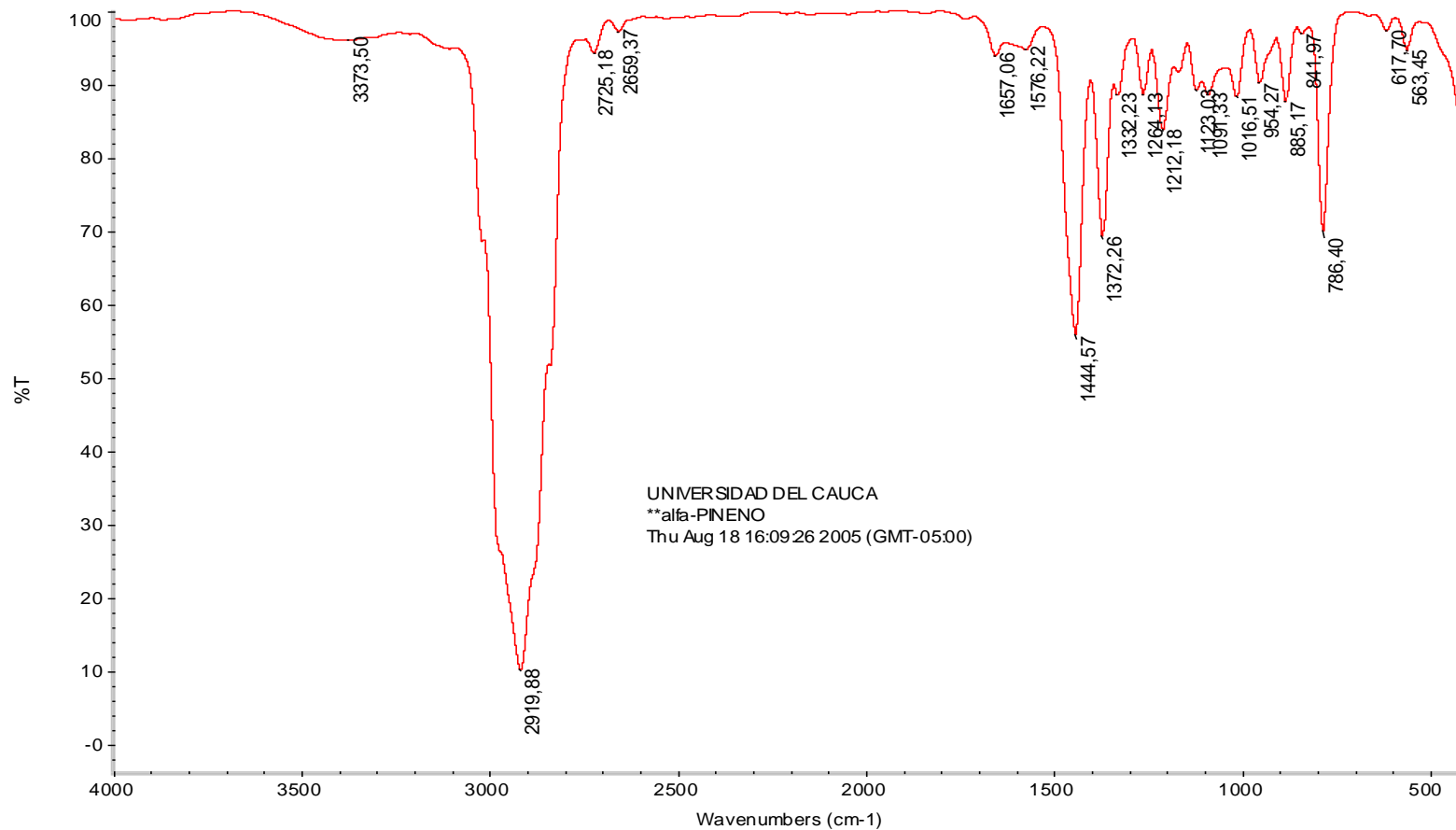
33. VELASCO N. A; PEREZ Alonso, PEREZ DE PAZ P.L.; SANZ Pául. Analysis by gas chromatography–mass spectrometry of the essential oils from the aerial parts of *Rutheopsis herbanica* (Bolle) Hans. & Kunk. gathered in Fuerteventura (Canary Islands) *Journal of Chromatography A*, 984. Páginas 159–162. *Islas Canarias (España)* 2003.
34. VIÑA Amparo, MURILLO Elizabeth. Essential Oil Composition From Twelve Varieties Of Basil (*Ocimum* spp) Grown In Colombia. *Journal of the Brazilian Chemical Society* Volumen 14 No. 5 Sao Paulo Sept. 2003.
35. MILLER J.C., MILLER J.N. *Estadística Para Química Analítica* segunda edición Addison-Wesley Iberoamericana , S.A. Estados Unidos 1993. Páginas:
36. QUATTROCCHI Oscar Alberto , ABELAIRA DE ANDRIZZI Sara Inés , LABA Raúl Felipe. *Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica*. 1992. Páginas: 301-326. biblio. Análisis estadístico.
37. QUIJANO Clara, Suárez Margoth, Duque Carmenza. Constituyentes Volátiles De Dos Variedades De Guayaba (*Psidium guajava* L.); Palmira ICA-1 y Glum Sali *Revista Colombiana de Química* Volumen 28, No. 1 de 1999.
38. JUI, CHUNG, SHIEH. Yield and Chemical Components of Essential Oils in *Eucalyptus grandis* Leaves. Division of Forest Chemistry , Taiwan Forestry Research Institute. New Series, 10 (1). Noviembre de 1994. Páginas:71-82.
- 39.FANG-QIU Guo, YI-ZENG Liang, CHENG-JIAN Xu, LAN-FANG Huang, XIAO-Ning Li. Comparison of the volatile constituents of *Artemisia capillaris* from different locations by gas chromatography–mass spectrometry and projection method. *Journal of Chromatography A*, 1054. China 2004. Páginas: 73–79.
40. MÜLLER DA SILVA Paulo Henrique., BRITO José Octávio., et al. Potential Of Eleven *Eucalyptus* Species For The Production Of Essential Oils. *Sci. Agric. Piracicaba (Brazil)* v.63. (2006). Páginas:85-89.
41. LÓPEZ S. Susana., y RAMÍREZ Arnoldo. *Cromatografía de Gases Fundamentos y Técnicas Modernas*. Universidad del Valle, Departamento de Química. Santiago de Cali, 1993. Páginas: 90-91.

ANEXOS

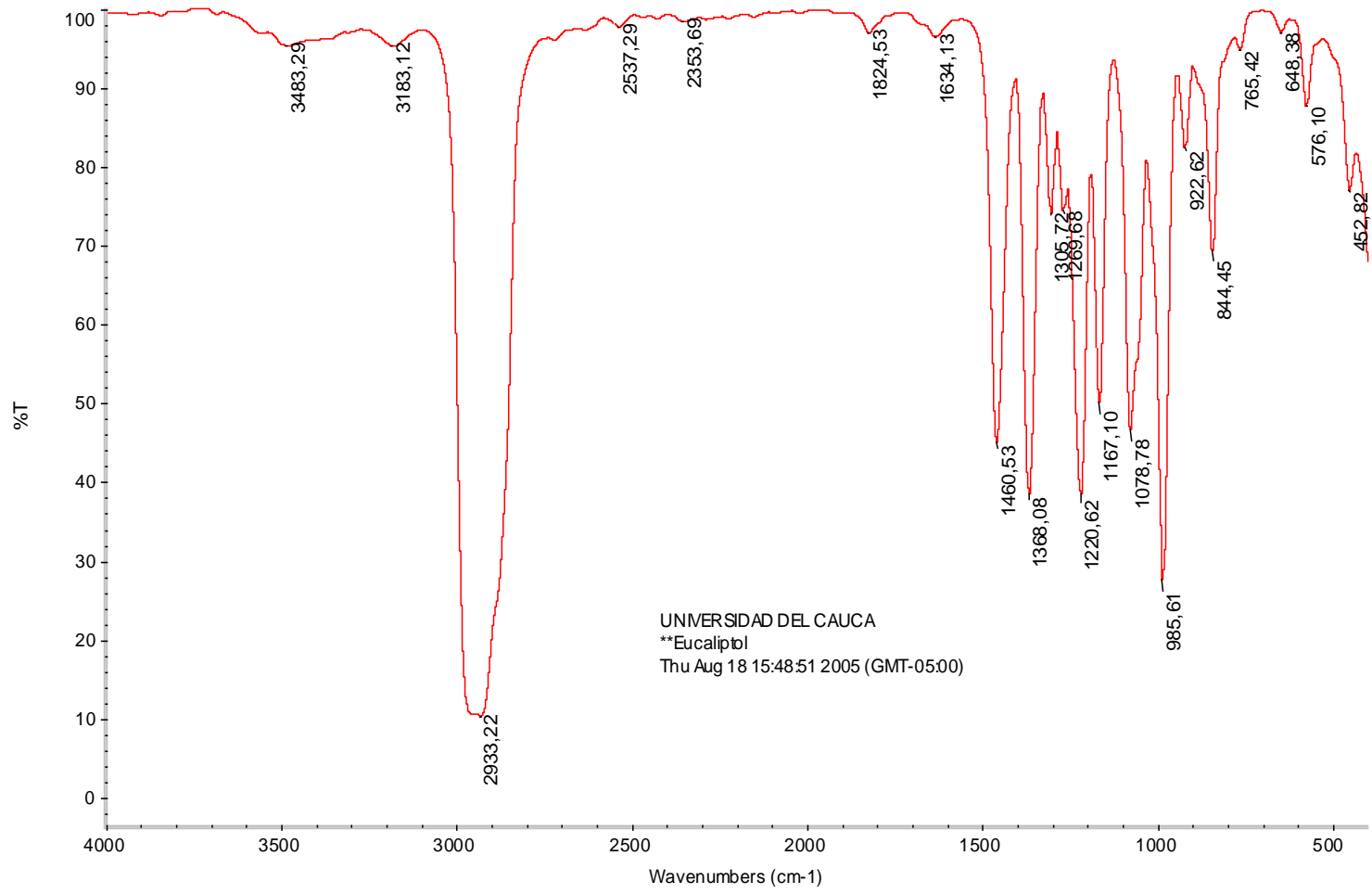
ANEXO A. ESPECTRO IR DEL ACEITE ESENCIAL DE *Eucalyptus grandis*



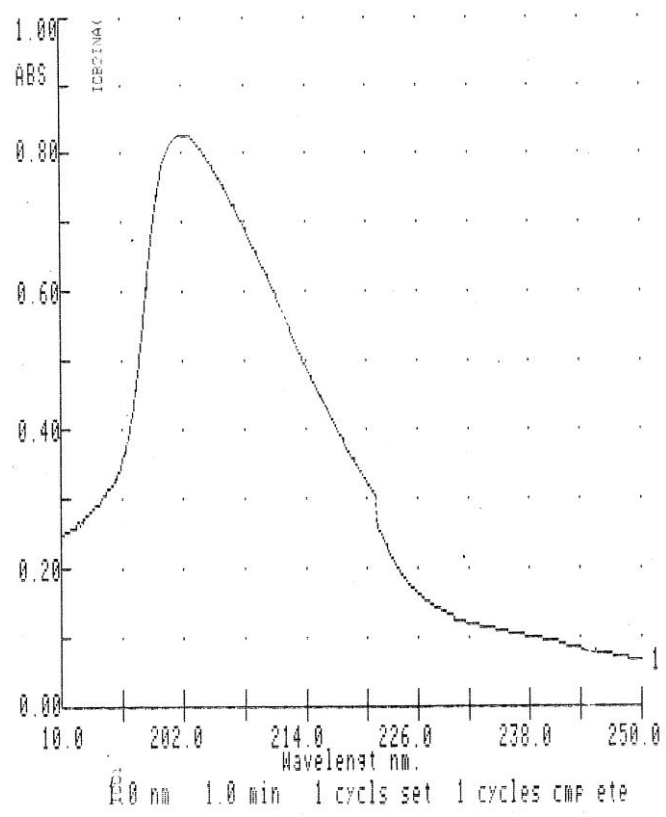
ANEXO B. ESPECTRO IR DEL ESTÁNDAR ALFA-PINENO



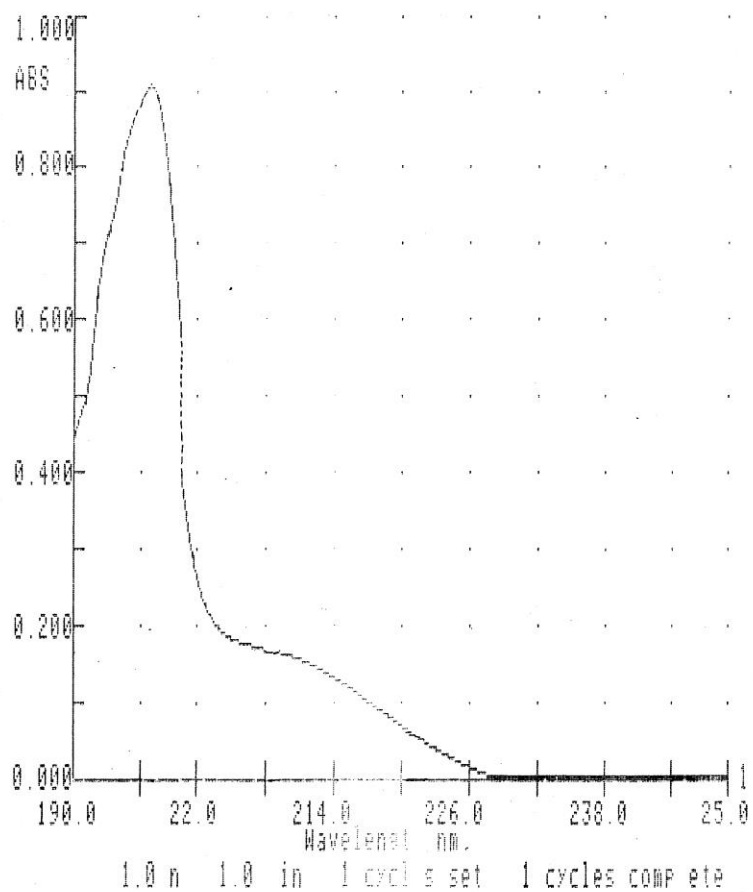
ANEXO C. ESPECTRO IR DEL ESTÁNDAR EUCALIPTOL



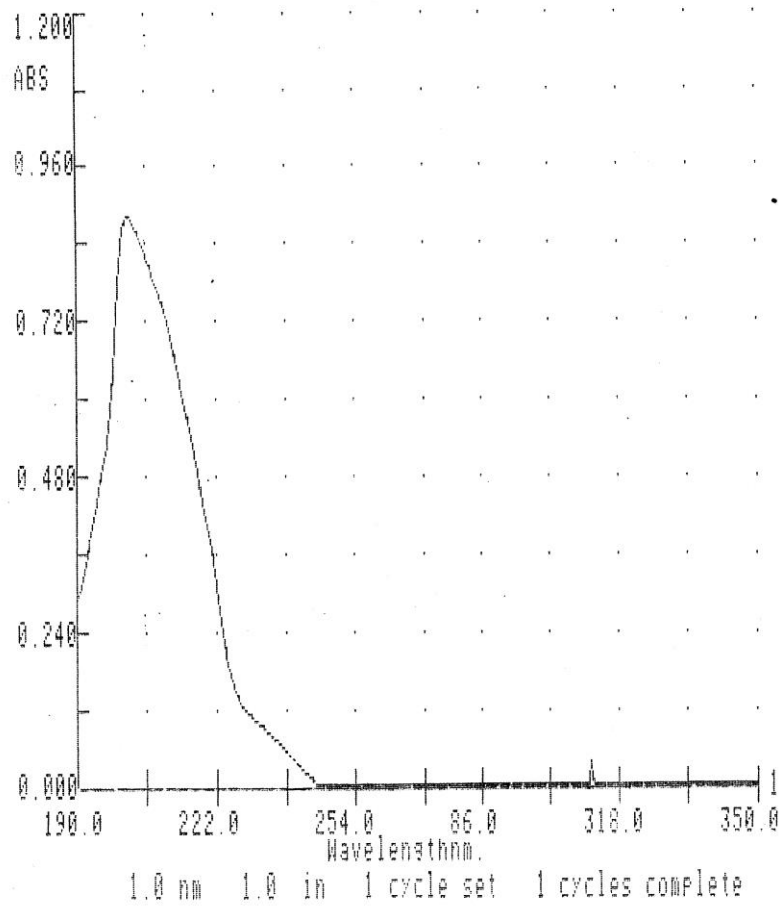
ANEXO D. ESPECTRO UV DEL ACEITE ESENCIAL DE *Eucalyptus grandis*



ANEXO E. ESPECTRO UV del estándar alfa-pineno.



ANEXO F. ESPECTRO UV del estándar eucaliptol



ANEXO G. Constancia de herbario de la especie *Eucaliptus grandis*




UNIVERSIDAD DEL CAUCA
Museo de Historia Natural
Herbario Universidad del Cauca (CAUP)

**EL SUSCRITO DIRECTOR DEL HERBARIO DE LA UNIVERSIDAD
DEL CAUCA (CAUP)**

HACE CONSTAR QUE:

Los estudiantes de Química LILIANA TRÓCHEZ LÓPEZ Y DARWIN HOYOS depositaron en el herbario una muestra vegetal colectada en la Finca Claridad del municipio de Popayán, rotulada con el número de colección 01 de los mencionados estudiantes y colectada el día 22 de septiembre de 2005. La muestra en mención fue identificada en el herbario como *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden.

Para constancia se firma en Popayán a los 20 días del mes de abril de 2006.


Bernardo R. Ramírez P.
Director del Herbario