

**COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITE
ESENCIAL UTILIZANDO PIPER ADUNCUM (CORDONCILLO) PROCEDENTE
DE LA ZONA CAFETERA**

**GLORIA CRISTINA ALBARRACÍN MONTOYA
SONIA GIOVANNA GALLO PALMA**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE MANIZALES
INGENIERIA QUÍMICA
DICIEMBRE DE 2003**

**COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITE
ESENCIAL UTILIZANDO PIPER ADUNCUM (CORDONCILLO) PROCEDENTE
DE LA ZONA CAFETERA**

ELABORADO POR

**GLORIA CRISTINA ALBARRACÍN MONTOYA Cód 396502
SONIA GIOVANNA GALLO PALMA Cód. 397018**

Trabajo de grado para optar el título de “Ingeniero Químico”

**LINEA DE PROFUNDIZACIÓN
TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS**

**MODALIDAD
TRABAJO FINAL**

**DIRECTOR
Qco. Msc. GILDARDO MONTOYA CADAVID**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE MANIZALES
INGENIERÍA QUÍMICA
DICIEMBRE DE 2003**

AGRADECIMIENTOS

Los autores del presente trabajo expresan sus agradecimientos a:

Carlos López, Decano de la Facultad de Química de la Universidad de Antioquia.

Jair Gaviria Arango, Director del Laboratorio de Análisis Instrumental de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.

Jaime Sepúlveda Subdirector de recursos naturales de Corpocaldas.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN	1
1. OBJETIVOS	3
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	3
1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	3
2. ANTECEDENTES.....	4
3. MARCO TEÓRICO.....	7
3.1 GENERALIDADES SOBRE PIPERACEAS (Piperaceae)	7
3.1.2 Aspectos químicos	7
3.2 HOJAS Y ESPIGAS DE PIPER ADUNCUM	8
3.2.1 Principales componentes del aceite esencial de las hojas y espigas de Piper aduncum	9
3.3 ACEITES ESENCIALES	12
3.3.1 Definición.....	12
3.3.2 Clasificación de los aceites esenciales	14
3.3.3 Distribución y estado natural	15
3.3.4 Propiedades de los aceites esenciales.....	16
3.3.5 Extracción y aislamiento.....	17
3.3.6 Análisis de la composición de los aceites esenciales.....	24
3.3.7 Propiedades fisicoquímicas de los aceites esenciales	28
4. METODOLOGÍA	33
4.1 IDENTIFICACIÓN DE LAS HOJAS Y ESPIGAS DE PIPER ADUNCUM	33
4.2 EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE PIPER ADUNCUM	33
4.2.1 Diseño experimental.	34
4.2.2 Extracción de aceite esencial mediante arrastre con vapor de agua.....	35
4.2.3 Extracción Del Aceite Esencial Mediante Hidrodestilacion.....	42

4.3 EVALUACION DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL ACEITE	46
4.4 IDENTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES COMPONENTES DEL ACEITE ESENCIAL DE PIPER ADUNCUM	47
5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	49
5.1 PROPIEDADES FÍSICAS DEL ACEITE ESENCIAL DE PIPER ADUNCUM	49
5.2 RESULTADOS DE LA EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE PIPER ADUNCUM	50
5.3 IDENTIFICACIÓN QUÍMICA DE LOS COMPUESTOS EN EL ACEITE ESENCIAL DE PIPER ADUNCUM	51
5.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	56
5.5 DETERMINACIÓN DE LOS COSTOS DE PRODUCCIÓN DEL ACEITE.....	67
6. BALANCES DE MATERIA.....	70
7. USOS DEL ACEITE ESENCIAL OBTENIDO.....	73
8. DIAGRAMA DE BLOQUES PRELIMINAR DEL PROCESO.....	78
9. CONCLUSIONES	79
10. RECOMENDACIONES.....	81
BIBLIOGRAFÍA	82

LISTA DE TABLAS

	pag
Tabla 1. Propiedades de la piperitona.	12
Tabla 2. Parámetros analíticos empleados en el control de calidad de aceites esenciales.	29
Tabla 3. Diseño experimental.	34
Tabla 4. Propiedades físicas del aceite esencial extraído	49
Tabla 5. Resultados de la extracción del aceite esencial obtenido	50
Tabla 6 Rendimientos en base a la cantidad de materia prima fresca Por ensayo	51
Tabla 7. Compuestos identificados muestra 1.	52
Tabla 8. Compuestos identificados muestra 2.	53
Tabla 9. Compuestos identificados muestra 3.	53
Tabla 10. Compuestos identificados muestra 4.	53
Tabla 11. Compuestos identificados muestra 5.	54
Tabla 12. Compuestos identificados muestra 6.	54
Tabla 13. Compuestos identificados muestra 8.	55
Tabla 14. Compuestos identificados muestra 9.	55
Tabla 15. Compuestos identificados muestra 10.	55
Tabla 16. Compuestos identificados muestra 11	56
Tabla 17. Análisis de varianza para la densidad	60
Tabla 18. Análisis de varianza para rendimiento	62
Tabla 19. Análisis de varianza para índice de refracción	65
Tabla 20. Costo preliminar de producción del aceite esencial	69

Tabla 21. Condiciones de operación, arrastre con vapor de agua, hojas.	
Tabla 22. Condiciones de operación, arrastre con vapor de agua, espigas.	85
Tabla 23. Condiciones de operación, hidrodestilación, hojas.	85
Tabla 24. Condiciones de operación, hidrodestilación, espigas.	86
	86

LISTA DE FIGURAS

	pag
Figura 1. Fórmula estructural del Dilapiol.	9
Figura 2. Fórmula estructural de la Miristicina.	10
Figura 3. Fórmula estructural de la Piperitona.	11
Figura 4. Métodos de extracción de mezclas aromáticas.	17
Figura 5. Equipo de extracción en vidrio para arrastre con vapor de agua	35
Figura 6. Generador de vapor.	38
Figura 7. Cámara de extracción.	39
Figura 8. Condensador.	39
Figura 9. Vaso florentino.	40
Figura 10. Montaje a presión para extracción de aceite esencial mediante arrastre con vapor de agua.	40
Figura 11. Equipo de extracción en vidrio para hidrodestilación	43
Figura 12. Montaje a presión para extracción de aceite esencial Mediante hidrodestilación	45
Figura 13 Patrones de comparación para el apiol	52
Figura 14. Efectos principales sobre densidad	61
Figura 15. Efectos principales sobre rendimiento	64
Figura 16. Efectos principales sobre índice de refracción	66
Figura 17. Gráfico de cajas y bigotes	67
Figura 18. Fórmula estructural del apiol	73
Figura 19. Fórmula estructural del germacreno	74
Figura 20. Fórmula estructural del cariofileno	74
Figura 21. Fórmula estructural del fenaldreno	75
Figura 22. Fórmula estructural del beta-pineno	75
Figura 23. Fórmula estructural del linalol	76

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. CONDICIONES DE OPERACIÓN DE LA EXTRACCIÓN MEDIANTE ARRASTRE CON VAPOR DE AGUA	85
ANEXO B. CONDICIONES DE OPERACIÓN DE LA EXTRACCIÓN MEDIANTE HIDRODESTILACIÓN.....	86
ANEXO C. NUMERACIÓN DE LOS ENSAYOS REALIZADOS	87
ANEXO D. FOTOGRAFÍAS DEL MATERIAL Y LOS EQUIPOS UTILIZADOS.....	88
ANEXO E. MÉTODOS UTILIZADOS EN LA CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL EXTRAÍDO	90
ANEXO F. ESPECTROS CROMATOGRÁFICOS GC/MS DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS DEL ACEITE ESENCIAL DE PIPER ADUNCUM.....	93

RESUMEN

El aceite esencial de *Piper aduncum* L. procedente de la zona cafetera, se extrajo de hojas y espigas utilizando las técnicas de arrastre con vapor de agua e hidrodestilación. El mejor rendimiento (2,1493%) fue obtenido por el método de hidrodestilación aplicado a las espigas del material, luego de incluir en el montaje el manejo de equipos presurizados.

La determinación de la composición química del aceite utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM) mostró como componente mayoritario el apiol con proporciones entre 54,4 y 70,664%, otros compuestos en cantidades significativas fueron: germacreno-d, cariofileno y piperitona. Se realizaron pruebas fisicoquímicas de las esencias y se estudió el tiempo de extracción como variable de influencia sobre su rendimiento y composición.

Las sustancias encontradas y sus respectivas cantidades en el aceite obtenido de la planta de esta región, plantean la posibilidad de sus utilización final como insecticida de acuerdo a la información recopilada sobre los estudios y usos del aceite esencial de *Piper aduncum*. Se realizó un cálculo preliminar del costo de producción del aceite obtenido.

De acuerdo al rendimiento del aceite, tiempos de extracción, propiedades evaluadas y componentes identificados, se compararon los dos métodos de extracción.

INTRODUCCIÓN

El estudio de los aceites esenciales como materias primas básicas para la industria de fragancias y sabores, se ha transformado en una de las áreas de investigación y desarrollo más importantes para muchos países. Inicialmente considerados como material de desecho del metabolismo de las plantas, la importancia biológica de los aceites esenciales ha sido reconocida sólo recientemente.^[1]

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, generalmente obtenidos por destilación con arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes), farmacéutica, agricultura (insecticidas) entre otros.^[2]

Los principales métodos de extracción de estos aceites son: métodos directos (compresión, raspado, lesiones mecánicas de la corteza), destilación (con agua o hidrodestilación, destilación con agua y vapor, destilación con vapor seco), extracción (con solventes volátiles, con solventes no volátiles, con fluidos supercríticos), enflourage (adsorción sólido-líquido y/o sólido-gas), headspace (purga y trampa simultáneas, purga y extracción con solvente simultáneas).^[3]

En general, los usos de los aceites esenciales dependen de los constituyentes mayoritarios identificados, la presencia o ausencia de unos u otros depende de características como: condiciones geobotánicas (suelo, luz, humedad y la altitud), método de cultivo (abonos, agroquímicos, momento de siembra, riego, pesticidas), época de recolección de la planta, método de almacenamiento del material vegetal (fresco, seco, etc), método de obtención del aceite (destilación, maceración, prensado, extracción con solventes o sin ellos, tipo de solvente, etc), edad de la planta.^[4]

Debido al interés cada vez mayor de explotar los recursos naturales disponibles en nuestro país surge la necesidad de realizar estudios para identificar las especies vegetales promisorias que no han sido hasta ahora estudiadas o que se conoce de su uso a través del conocimiento popular. ^[5]

Los aceites esenciales se encuentran en una gran variedad de plantas, incluidas las Piperáceas (familia a la cual pertenece el *Piper aduncum*) una cualidad de las plantas de este género es la de poseer aromas que son característicos de cada especie. ^[6]

Aunque en Colombia se realizó un estudio sobre el aceite esencial de *Piper aduncum* recolectado en Santandercito (Cundinamarca)^[7], los compuestos mayoritarios, o sus cantidades pueden variar de acuerdo a la región de donde provenga la especie^[4]. Con este trabajo se busca caracterizar el aceite de *Piper aduncum* de la Zona Cafetera y comparar los métodos de extracción según el rendimiento, propiedades y componentes identificados.

La mayoría de los estudios realizados con piperáceas reportan el método de hidrodestilación para la extracción de su aceite esencial, en este trabajo se pretende comparar este método con la técnica de arrastre con vapor de agua y así reportar diferencias y/o ventajas entre estos dos.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Comparar dos métodos de extracción (hidrodestilación y arrastre con vapor de agua) de aceite esencial, utilizando *Piper aduncum* (cordoncillo) procedente de la Zona Cafetera.

1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Obtener aceite esencial de *Piper aduncum* mediante los métodos de hidrodestilación y arrastre con vapor de agua.
- Determinar los rendimientos de los aceites extraídos a través de los balances de masas.
- Determinar la influencia del tiempo de operación sobre los dos procesos de extracción.
- Evaluar algunas propiedades fisicoquímicas de los aceites extraídos.
- Determinar la composición química de los aceites obtenidos por métodos espectroscópicos.
- Consultar las posibles aplicaciones del aceite esencial obtenido.
- Estimar el valor comercial del aceite puro.

2. ANTECEDENTES

Las piperáceas son una familia tropical con ocho géneros que se reconocen por sus hojas simples y por tener flores muy pequeñas, sin perianto, en forma de espiga simple y apretada. Generalmente son hierbas, arbustos o árboles muy pequeños. El género *Piper* (constituído por más de 700 especies) presenta tallos con nudos engrosados y las inflorescencias son espigas solitarias opuestas a las hojas que están dispuestas en forma alternada.^[8]

Morton (1981) recopiló una serie de usos que se le dan en la medicina popular de América: en Guatemala y México la planta tiene valor como astringente, estimulante digestivo y diurético. En Cuba se utiliza además como hemostático y como remedio para las hemorroides, gonorrea, leucorrea, para las hemorragias menstruales y, en baños, para el tratamiento de varias dolencias externas. En Islas Vírgenes se toma la decocción de la planta como sedante, laxante y bebida refrescante.^[9]

En América Central y Brasil, tiene usos semejantes. En Brasil se usa además contra la diarrea y la disentería, para dolores de muela, carminativo y antiulceroso^[10]

Desde el punto de vista químico, se encuentran en la literatura estudios acerca de la identificación de los componentes mayoritarios del aceite esencial de esta especie y de algunas variedades recolectadas en diversas partes del mundo. Smith y Kassim (1979) informaron que los constituyentes principales del aceite obtenido por destilación al vapor de hojas frescas recolectadas en las Islas Fiji son dilapiol (58%) y piperitona (4%). Gottlieb y otros (1981) estudiaron los componentes principales de las variedades brasileñas *P. aduncum* var. *aduncum* y *P. aduncum* var. *cordulatum* encontrando dilapiol (74.5% y 88.4% respectivamente) y trazas de alcanfor en la primera. Gupta y otros (1983) investigaron la composición del aceite esencial de las hojas frescas de la planta recolectada

en Panamá encontrando dilapiol (90%) como componente mayoritario, pero no encontraron piperitona^[9]; El aceite esencial obtenido de 4 diferentes variedades en la región amazónica tiene como componente mayoritario al dilapiol en un rango desde 3.4 a 12 %. ^[11]

Díaz y otros (1984), identificaron de la planta recolectada en Colombia (en la zona de Santandersito, Cundinamarca), como constituyentes mayoritarios dilapiol, miristicina y piperitona^[7]. En este mismo trabajo, se reporta un porcentaje de extracción de 0.8%, obtenido por hidrodestilación de hojas frescas y con propiedades $\eta_D^{25} = 1.5040$ y $\rho^{20} = 0,9796$ g/ml^[7].

La extracción de los constituyentes volátiles de hojas y espigas de *Piper aduncum* procedentes de Costa Rica, utilizando la técnica de hidrodestilación en hojas y espigas, tuvo un rendimiento entre 0.4 y 1.3 % de aceite, presentándose la mayor cantidad en sus espigas, los valores de las propiedades fueron η_D^{20} : Entre 1.506 y 1.516, ρ^{22} : Entre 1.020 y 1.050 g/ml.^[9]

El aceite esencial de *Piper aduncum* en concentración de 20 mg/ml presenta actividad antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Cryptococcus neoformans*, *Sacharomyces cerevisiae* y *Mycobacterium smegmatis* y una débil actividad contra *Aspergillus flavus* y *Trochophyton mentagrophytes*^[10]. El componente químico aislado 2,6-dihidroxi-4-metoxichalcone inhibió el crecimiento in vitro del 98% de los parásitos de *leishmania amazonensis*^[12].

El dilapiol, uno de los componentes mayoritarios del aceite esencial de *Piper aduncum*, reduce el crecimiento de larvas de pestes de insectos, incluida la larva de la mayor peste de maíz en Norte América, *Ostrinia nubilalis*^[13]; La miristicina se comporta como sustancia oxiótica, actúa como inhibidor de la monoaminoxidasa comportándose como antidepresivo; ambos componentes, el dilapiol y miristicina, son conocidos por su actividad insecticida y su uso como sinergistas de insecticidas organofosforados y carbamatos^[13].

El dilapiol y su isómero el isodilapiol han demostrado actividad fungitóxica contra el *Helminthosporium oryzae* y el *Aspergillus Níger*^[15].

A través de estudios realizados por Lichtenstein y otros se reportó la actividad insecticida y biológica de los componentes mayoritarios del *Piper aduncum*: Apiol, dilapiol y miristicina, estos mostraron mayor actividad que otros compuestos como el d-carbona que también está presente en plantas^[16]. La piperitona ha sido también reportada como repelente^[17] y presenta actividad funguicida en hongos patógenos de la caña de azúcar^[18]; a partir de mezclas racémicas de piperitona se realizaron bioensayos que mostraron su efectividad como repelente de la mosca doméstica^[19].

3. MARCO TEÓRICO

3.1 GENERALIDADES SOBRE PIPERACEAS (Piperaceae)

3.1.1 Aspectos botánicos

Las Piperaceas son una familia tropical de arbolitos, arbustos y trepadoras leñosas, esta familia comprende 10 géneros, siendo los principales Piper y Peperomia. Las Piperaceas como una familia pantropical se cree que crecen principalmente en los bosques pluviales. Sus caracteres diagnósticos son: hojas alternas, simples, enteras, con glándulas que contienen esencia de olor picante y pecíolos que abrazan el tallo; las estípulas cuando existen se encuentran soldadas al pecíolo; flores diminutas, desnudas, bisexuales o unisexuales dispuestas en racimo o en espiga, generalmente opuestos a las hojas, los tallos tienen nodos, pueden ser articulados aéreos y subterráneos, presentan el tejido vascular primario en 2 o más anillos, o anillos pequeños esparcidos; el fruto es una drupa o baya, y consta de una semilla^[20].

3.1.2 Aspectos químicos

En el genero Piper ha sido reportada la presencia de metabolitos del ácido mevalónico (monoterpenos y sesquiterpenos), metabolitos del ácido acético y shikimico (flavonoides) y relacionados al ácido shikimico (lignoides, arilopropanoides, amidas, etc.). Los metabolitos más frecuentemente aislados son amidas (cinnamoilamidas y alquilamidas), aristolactamas y otros alcaloides, flavonoides (flavona, dihidroflavonas, dihidrochalconas, y o-metilflavonoides) notándose que la o-glicosilación es rara^[20].

3.2 HOJAS Y ESPIGAS DE PIPER ADUNCUM

El *Piper aduncum* es una planta dicotiledónea, arbustiva, perenne de 1,80 a 5 m de altura, raíz pivotante, tallo erguido, leñoso, ramificado, con ramas ascendentes, nudoso, con entrenudos floríferos más bien delgados y cortos, esparcidamente pubescente, hojas lanceoladas o subelípticas, agudamente acuminadas, con la base redondeada o un poco cordada, pinnadamente nerviadas hasta la mitad o tercera parte superior, con 6 a 8 nervaduras en cada lado, con pecíolos cortos; inflorescencia en espigas, gradualmente encorvadas y con cabillo largo, las flores son inconspicuas, sésiles, glabras, de color blanquecino o amarillento; el fruto es pequeño ovoide, más o menos di o tetragono y glabro; se propaga por semilla y vegetativamente por estacas^[12].

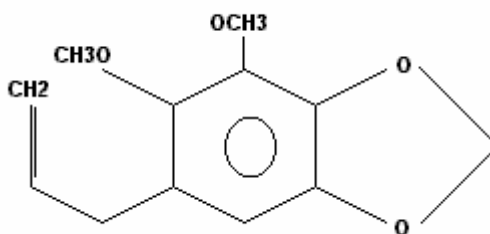
El *Piper aduncum* contribuye en la reforestación y conservación de la biodiversidad y biomasa del bosque y actúa como barrera natural contra la erosión; Su madera es utilizada como combustible, en estacas, cercas e incluso haciendo parte de construcciones rudimentarias. Crece en zonas con altitudes entre 0 y 1.800 msnm y temperatura superiores a 17,5°C, es maleza en cultivos, potreros, caminos y cafetales, es una planta de importancia apícola, es medicinal y se usa como antineurálgica y estupefaciente de la lengua, la decocción de las hojas se usa como tónico en disentería, para curar llagas rebeldes. La raíz en decocción se usa contra hemorragias internas^[8].

3.2.1 Principales componentes del aceite esencial de las hojas y espigas de *Piper aduncum*

Dilapiol (C₁₂H₁₄O₄)

5-Alil-1,6 dimetoxi-2,3-metilendioxi-benzeno.

Figura 1. Fórmula estructural del dilapiol



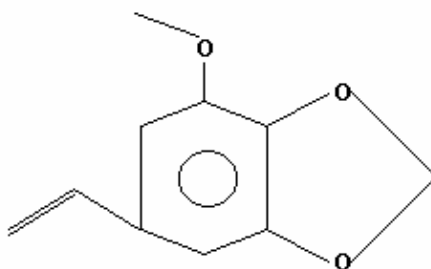
El dilapiol es un fenilpropanoide derivado del ácido benzoico, monolignoide.

- Aislamiento: por destilación fraccionada.
- Caracterización: en tratamiento con exceso de bromuro forma monobromoapiole C₁₂H₁₃Br₃O₄; incoloro que funde a 107°C ; en tratamiento con KOH alcohólico se convierte en diisoapiol, que funde a 44°C y ebulle a 296°C; en oxidación con solución de K₂MnO₄ alcalino se convierte en dilapiolaldehido C₁₀H₁₀O₅ que funde a 75°C y ácido dilapiólico C₁₀H₁₀O₆ que funde entre 151°C y 152°C^[15].
- Propiedades: el dilapiol es viscoso e inodoro n_D²⁵=1,52778; pe=285; PM= 222,23^[22]

Miristicina: (C₁₁H₁₂O₃)

4-alil-6-metoxi-1,2-metilendioxibenceno.

Figura 2. Fórmula estructural de la miristicina.

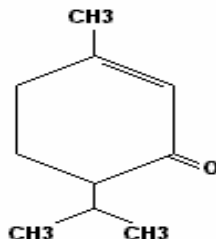


- Aislamiento: por destilación fraccionada
- Caracterización: en tratamiento con bromuro la miristicina da dibromomiristicina dibromuro (C₃H₅Br₂)*C₆Br₂(O₂CH₂)*(OCH₃) que funde a 130°C.; la miristicina en oxidación con permanganato produce miristicina aldehído que funde a 130°C y ácido miristicínico, que funde entre 208°C y 210°C^[22].
- Propiedades: olor ligeramente aromático, no congelable a bajas temperaturas, Se encuentra principalmente en el aceite de nuez moscada, es cristalina y debido a su elevado punto de ebullición se encuentra principalmente en las últimas fracciones del destilado, es tóxica para el hombre, dosis elevadas de nuez moscada o de su esencia pueden producir convulsiones, la miristicina se relaciona con las anfetaminas^[24]. También aparece en el aceite de eneldo y en el aceite de los frutos del perejil^[28], n_D²⁰ = 1,54032. ; PM=192,21.

Piperitona: (C₁₀H₁₆O)

3-metil – 6 (1- metiletil) – 1,2-ciclohexano

Figura 3. Fórmula estructural de la piperitona.



La molécula está constituida por: C: 78,89% H: 10,59 % O: 10,51 %. La forma racémica de la piperitona puede ser preparada sintéticamente mientras ambas formas (d y l) aparecen en muchos aceites esenciales.

d-piperitona: puede ser encontrada en el aceite de *Menta arvensis var. Piperascens*; esta forma el componente mayoritario del aceite de *Andropogon iwarancusa* (cerca al 80%) y del aceite de *cymbopogon sennaarensis* (cerca al 45%).

l-piperitona: se presenta en muchas especies de eucalipto, por ejemplo *eucalyptus dives* (cerca del 40%) y del *eucalyptus radiata*

- Aislamiento: por destilación fraccionada.
- Caracterización: para la preparación de l-piperitona puede emplearse baja temperatura y recristalización a partir del aislamiento de este derivado terpénico; la piperitona puede ser detectada por la reducción de la cetona en una solución alcohol-éter con amalgama de sodio que reacciona para producir pinacone (C₂₀H₃₄O₂); un tratamiento con semicarbacida da una mezcla de dos semicarbazonas (dl piperitona)^[22].

- Propiedades: piperitona en aceite posee un olor de menta alcanfor; incolora cuando está recién destilada para tornarse amarilla en agitación, PM=152,23^[22]

Tabla 1. Propiedades de la piperitona.

	d-piperitona	l-piperitona	dl-piperitona
Índice de refracción N_D^{20}	1,4848	1,4848	1,4845
Punto de ebullición °C	116-118,5	232,5-234,7	235-237

3.3 ACEITES ESENCIALES

3.3.1 Definición

Se trata de sustancias líquidas, aromáticas y volátiles situadas en cualquier parte del vegetal, (cavidades, células, pelos o canales secretores) conformadas por un grupo heterogéneo de sustancias orgánicas (alcoholes, aldehidos, ésteres, cetonas, etc)^[14]. Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes que pueden tener la siguiente naturaleza química:

Compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos)

- Monoterpenos (diez carbonos)
- Sesquiterpenos (quince carbonos)
- Fenilpropanos^[2].

En su gran mayoría son de olor agradable, aunque existen algunos de olor relativamente desagradable como por ejemplo los componentes que forman parte de la fracción aromática del ajo y la cebolla, los cuales contienen compuestos azufrados^[2].

Los aceites pueden estar asociados formando mezclas con otros productos naturales como es el caso de las resinas y productos relacionados^[2].

Siendo una parte del metabolismo de la planta, la composición química de una esencia está permanentemente variando, modificándose las proporciones de sus constituyentes o transformándose unos constituyentes en otros, según la parte de la planta, el momento de su desarrollo o el momento del día. Más aún debe tenerse en cuenta que dada su compleja composición, presenta una alta probabilidad de sufrir modificaciones fisicoquímicas por reacciones entre sus propios constituyentes o entre éstos y el medio (la luz, la temperatura, presencia de enzimas, los componentes del reservorio donde se almacena la esencia, etc)^[2]

Una esencia está en permanente cambio, no solamente mientras forma parte del metabolismo de la planta, también después de extraída; esto habla de una estabilidad reducida y de un proceso de transformación continuo, que genera tres etapas en la vida de una esencia: la de maduración o añejamiento, la de estabilidad o vida útil y la de descomposición o enranciamiento, cada esencia tiene distintos tiempos para cada etapa, inclusive según el caso, la etapa intermedia, donde se considera que los cambios habidos no modifican significativamente la calidad de la misma, puede tener una tendencia positiva o negativa^[2].

Debido a la complejidad de la composición química de una esencia, se hace una discriminación entre los compuestos contenidos en ella, se habla entonces de compuestos mayoritarios, cuando están en la esencia en una proporción mayor al 1 o 0,5%^[2].

3.3.2 Clasificación de los aceites esenciales

Los aceites esenciales se agrupan de acuerdo a diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios^[2].

Consistencia

Según su consistencia los aceites esenciales se clasifican en esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas. Las esencias fluidas son líquidos volátiles a temperatura ambiente. Los bálsamos son más espesos, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización, por ejemplo el bálsamo de copaiba, el bálsamo del Perú, Benjuí, bálsamo de Tolú, Estoraque, etc. Las oleorresinas tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas (caucho, gutapercha, chicle, oleorresina de paprika, de pimienta negra, de clavel, etc.)^[2].

Origen

Pueden ser de origen natural, artificial o sintético. Los naturales se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, debido a su rendimiento tan bajo son muy costosas. Los artificiales se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes, por ejemplo la mezcla de esencias de rosa, geranio y jazmín enriquecida con linalol o la esencia de anís enriquecida con anetol. Los aceites esenciales sintéticos como su nombre lo indica son los producidos por la combinación de sus componentes los cuales, la mayoría de las veces, se producen por procesos de síntesis química. Estos son más económicos y por lo tanto son mucho más utilizados como aromatizantes y saborizantes (esencias de vainilla, limón, frutilla, etc.)^[2]

Componentes mayoritarios

Desde el punto de vista químico y a pesar de su complejidad, los aceites esenciales se pueden clasificar de acuerdo con los componentes mayoritarios como:

- Monoterpénicos: por ejemplo los que contienen la hierbabuena, la albahaca y la salvia.
- Sesquiterpénicos como los de copaiba, pino y junípero.

Los monoterpenos y sesquiterpenos son terpenos de 10 y 15 átomos derivados biosintéticamente de geranilpirofosfato (GPP) y farnesilpirofosfato (FPP) respectivamente^[24].

- Fenilpropanoides como los de clavo, canela y anís.

Los fenilpropanos son sustancias naturales ampliamente distribuidas en los vegetales caracterizadas por un anillo aromático unido a una cadena de 3 carbonos y derivados biosintéticamente del ácido shikímico, la cadena lateral puede presentar varios estados de oxidación (grupos metilo, hidroximetileno, aldehído y carboxilo) e insaturación. El anillo aromático generalmente está sustituido en los carbonos 3, 4 y 5, siendo estos sustituyentes grupos hidroxilo, metoxilo o metiléndioxi, principalmente^[24].

Aunque esta clasificación es muy general resulta útil para estudiar algunos aspectos fitoquímicos de dichos compuestos, sin embargo existen clasificaciones más complejas que tienen en cuenta otros aspectos químicos.

3.3.3 Distribución y estado natural

Los aceites esenciales se encuentran ampliamente distribuidos en plantas que incluyen las labiadas, lauráceas, mirtáceas, pináceas, rosáceas, rutáceas, umbelíferas, etc.

Se les puede encontrar en diferentes partes de la planta: en las hojas (ajenjo, albahaca, eucalipto, hierbabuena, mejorana, menta, pachulí, romero, salvia, etc.), en las raíces (angélica, cúrcuma, jengibre, sándalo, sazafrán, valeriana, vetiver, etc.), en el pericarpio del fruto (cítricos como limón, mandarina, naranja, etc.), en las semillas (anís, cardamomo,

hinojo, comino, etc.), en el tallo (canela, etc.), en las flores (lavanda, manzanilla, piretro, tomillo, rosa, etc.) y en los frutos (nuez moscada, perejil, pimienta, etc.).

Aunque en los aceites esenciales tanto los monoterpenos, los sesquiterpenos y los fenilpropanos se les encuentra en forma libre, más recientemente se han investigado los que están ligados a carbohidratos ya que se considera que son los precursores inmediatos del aceite como tal^[2].

3.3.4 Propiedades de los aceites esenciales

Los aceites esenciales se caracterizan por su olor pronunciado y penetrante, generalmente agradable, que siempre nos recuerda el olor del vegetal del que proviene, pero generalmente menos suave. Tienen sabor cáustico, acre e irritante y a veces aromático, dulce y delicado. Son sustancias de aspecto oleoso poco solubles o insolubles en el agua, a la que le comunican su aroma característico; solubles en alcohol absoluto, en el sulfuro de carbono, en éter de petróleo, en tetracloruro de carbono y demás solventes orgánicos, son volátiles y en su mayoría líquidos a la temperatura ambiente. Su peso específico a 15°C oscila entre 0.8 y 1.2, en los aceites etéreos el punto de ebullición varía entre 150 y 300°C. En lo que respecta a la volatilidad, todos los perfumes son más o menos volátiles y el conocimiento de su grado de volatilidad es un factor de importancia, pues estas esencias no se preparan aisladas, sino en combinación con otras que deben tener las mismas características, tanto en la solubilidad como en la volatilidad^[5].

Si los aceites esenciales se dejan en contacto con el aire, se oxidan, solidifican y resinifican, perdiendo su olor característico, al igual que se alteran fácilmente bajo la acción de la luz, volviéndose amarillos y oscuros, modificándose asimismo su perfume^[5]. La acción del aire sobre estas sustancias, se debe a la transformación de los terpenos, razón por la cual se trata de eliminarlos por distintos procedimientos, obteniéndose entonces las esencias desterpénadas cuya solubilidad e inalterabilidad es mucho más grande^[5].

Las esencias se unen con facilidad a las grasas y a los aceites fijos a los que disuelve. Cuando se encuentran puros son incoloros, pero como siempre llevan disueltos ciertas impurezas afectan diversos colores así, son amarillos y pardos como el clavo aromático, azulados como el ajeno, la manzanilla y el cálamo o bien verdes como la bergamota y el Cayeput. Arden fácilmente como llama fuliginosa^[5].

En algunos casos como consecuencia de la oxidación, llega a producir ácido carbónico, como por ejemplo la esencia de anís; otras veces ácido benzoico, como en la esencia de almendra y también ácido cinámico, como en el de canela^[5].

Los aceites esenciales refractan la luz polarizada, propiedad que se usa para su control de pureza, pues tienen por ello un índice de refracción característico. También presentan un poder rotatorio característico, en razón de que poseen en su composición numerosos productos ópticamente activos^[2].

3.3.5 Extracción y aislamiento

Los diferentes procesos de extracción utilizados en la obtención de aceites esenciales y extractos aromáticos, se pueden resumir de la siguiente forma:

Figura 4. Métodos de extracción de mezclas aromáticas^[2].

Métodos de extracción de mezclas aromáticas			
Metodo	Procedimiento	Productos obtenidos	
1 Métodos directos	1.1 Extrusión	1.1.1 Compresión de cáscaras	Aceites esenciales cítricos
		1.1.2 Raspado de cáscaras	
	1.2 Macerado	1.2.1 Lesiones mecánicas en cortezas	gomas, resinas, bálsamos
2. Destilación	2.1 Directa		Aceites esenciales y aguas aromáticas
	2.2 Arrastre con vapor de agua (directo indirecto, a presión, a vacío)		
	2.3 Destilación-maceración (liberación enzimática de agliconas en agua caliente)		

3. Extracción con solventes	3.1 Solventes volátiles	3.1.1 En caliente	infusiones y resinoides alcohólicos
		3.1.2 En frío	concretos y absolutos
	3.2 Solventes fijos (grasas y aceites)	3.2.1 En caliente	absolutos de pomadas
		3.2.2 En frío	absolutos de enflorados
4. Técnicas de vanguardia	4.1 utilización de ultrasonidos en el proceso extractivo de hidrodestilación		
	4.2 Extracción por microondas		
	4.3 Extracción con fluidos en estado supercrítico		

Destilación con agua (hidrodestilación)

El principio de la destilación en agua es llevar a estado de ebullición una suspensión acuosa de un material vegetal aromático, de tal manera que los vapores generados puedan ser condensados y colectados. El aceite, que es inmisible en agua, se separa posteriormente^[5].

En la destilación con agua el material vegetal siempre debe encontrarse en contacto con el agua, si el calentamiento del equipo es con fuego directo, el agua presente en la cámara extractora debe ser suficiente y permanente para llevar a cabo toda la destilación a fin de evitar el sobrecalentamiento y carbonización del material vegetal, dado que este hecho provoca la formación de olores desagradables en el producto final; el material vegetal debe ser mantenido en constante agitación a fin de evitar aglomeraciones o sedimentación del mismo en el fondo del recipiente, lo cual puede provocar su degradación térmica.^[5]

El tiempo total de destilación es función de los componentes presentes en el aceite esencial. Si el aceite contiene compuestos de alto punto de ebullición, el tiempo de destilación deberá ser mayor, los aceites esenciales obtenidos mediante destilación en agua normalmente presentan notas más fuertes y un color más oscuro con respecto a los producidos por otros métodos^[5].

Destilación por arrastre con vapor de agua.

En la destilación por arrastre con vapor de agua, la muestra vegetal generalmente fresca y cortada en trozos pequeños, se coloca en un recipiente cerrado y sometida a una corriente de vapor de agua, la esencia así arrastrada es posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa. Esta técnica es muy utilizada especialmente para esencias muy volátiles, por ejemplo las utilizadas para perfumería. Se utiliza a nivel industrial debido a su alto rendimiento, a la pureza del aceite obtenido y porque no requiere tecnología sofisticada.^[5]

La destilación por arrastre con vapor que se emplea para extraer la mayoría de los aceites esenciales es una destilación de mezcla de dos líquidos inmiscibles y consiste en una vaporización a temperaturas inferiores a las de ebullición de cada uno de los componentes volátiles por efecto de una corriente directa de vapor de agua, el cual ejerce la doble función de calentar la mezcla hasta su punto de ebullición y adicionar tensión de vapor a la de los componentes volátiles del aceite esencial; los vapores que salen de la cámara extractora se enfrían en un condensador donde regresan a la fase líquida, los dos productos inmiscibles, agua y aceite finalmente se separan en un dispositivo decantador o vaso florentino^[5].

Destilación con agua – vapor

En este caso el vapor puede ser generado mediante una fuente externa o dentro de la propia cámara extractora, aunque separado del material vegetal, la diferencia radical existente entre este sistema y los anteriormente mencionados es que el material vegetal se encuentra suspendido sobre un tramado (falso fondo) que impide el contacto del material vegetal con el medio líquido en ebullición, este sistema reduce la capacidad neta de carga de materia prima dentro del extractor pero mejora la calidad del aceite obtenido^[5]

Estos procesos de destilación como tal no tienen una diferencia fundamental desde el punto de vista teórico, sin embargo existen ciertas variaciones en la práctica y en los resultados obtenidos que en muchos casos son considerables, esto depende del método empleado porque ciertas reacciones pueden ocurrir durante la destilación^[21].

Los principales efectos que acompañan estos procesos son:

- Difusión del aceite esencial y del agua caliente a través de las membranas de la planta.
- Hidrólisis de ciertos componentes del aceite esencial.
- Descomposición ocasionada por el calor^[21].

En la destilación por arrastre con vapor, los componentes volátiles son retenidos por las membranas si estas se encuentran secas (material vegetal seco) lo que hace necesario un remojo del material, esto se logra con la condición de vapor saturado. Diferentes condiciones son logradas si el material se remoja con agua fría o caliente además, entran en juego factores como la solubilidad y las temperaturas^[21].

En la presencia de agua y particularmente a altas temperaturas pueden ocurrir reacciones que favorecen la formación de compuestos, como alcoholes y ácidos por descomposición de los ésteres, causantes de una disminución en la producción del aceite, esta es una de las desventajas de la hidrodestilación pues por la cantidad de agua presente puede producirse mayor hidrólisis; En el caso de la destilación agua vapor, el grado de hidrólisis es mucho menor y lo es aún menos en la destilación por arrastre con vapor de agua^[21].

Prácticamente todos los constituyentes de los aceites esenciales son algo inestables a altas temperaturas; Para obtener la mejor calidad del aceite es necesario asegurar que durante la destilación haya una baja temperatura o si es del caso tener altas temperaturas durante el menor tiempo posible. En el caso de la hidrodestilación o la destilación agua- vapor la temperatura es determinada por la presión de operación; En la destilación por arrastre con

vapor de agua la temperatura puede ser cercana a 100 °C dependiendo de si es usado vapor saturado a baja presión o vapor sobrecalentado^[21].

Extracción con solventes volátiles

En este método, la muestra seca y molida se pone en contacto con solventes tales como alcohol, cloroformo, etc. Estos solventes solubilizan la esencia pero también solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas y ceras, obteniéndose al final una esencia impura. Se utiliza a escala de laboratorio pues a nivel industrial resulta costoso por el valor comercial de los solventes, pues se obtienen esencias impurificadas con otras sustancias, y además por el riesgo de explosión e incendio característicos de muchos solventes orgánicos volátiles^[5].

Enfleurage

En el método de enflorado o *enfleurage*, el material vegetal (generalmente flores) es puesto en contacto con una grasa. La esencia se solubiliza en la grasa que actúa como vehículo extractor. Se obtiene inicialmente una mezcla (concreto) de aceite esencial y grasa la cual se separa posteriormente por otros medios fisico-químicos. En general se recurre al agregado de alcohol caliente a la mezcla y su posterior enfriamiento para separar la grasa (insoluble) y el extracto aromático (absoluto). Esta técnica se emplea para la obtención de esencias florales (rosa, jazmín, azahar, etc.), pero su bajo rendimiento y la difícil separación del aceite extractor la hacen costosa^[5].

Destilación previa maceración

En algunos casos las plantas aromáticas requieren ser sometidas a un proceso de maceración en agua caliente para favorecer la separación de su aceite esencial ya que sus componentes volátiles están ligados a componentes glicosidados^[2]

Procesos de expresión aplicados a frutos cítricos

Los fenómenos que ocurren durante la extracción del aceite se clasifican en varias etapas:

- Laceración de la epidermis y de las celdas que contienen la esencia.
 - Generación en la cáscara de áreas con presión mayor que sus circundantes a través de las cuales el aceite fluye al exterior.
 - Abrasión de la cáscara, con la formación de pequeñas partículas de la raspadura.
- La extracción del aceite se realiza sobre la fruta entera o sobre la cáscara y en ambos procesos se puede realizar con un proceso manual o mecánico^[5]

Utilización de los ultrasonidos en el proceso extractivo de hidrodestilación.

La aplicación del ultrasonido facilita la liberación del aceite esencial de las paredes celulares de la materia vegetal sometida al proceso extractivo, se caracteriza por transmitir cantidades sustanciales de energía por la acción de vibraciones de las partículas presentes en el medio de extracción, la aplicación del ultrasonido depende de la composición del fenómeno acústico que se produce dentro del tipo del material al cual es aplicado, además que las presiones acústicas causan fenómenos de cavitación aunado a microcorrientes en los líquidos, calentamiento y fatiga en los sólidos. Así mismo hay que tomar en cuenta que la aceleración ultrasonora es responsable de la inestabilidad que ocurre en la interfase líquido-líquido y líquido-gas^[5].

Extracción por microondas

Consiste en calentar el agua contenida en el material vegetal, que a su vez está inmerso en un disolvente “transparente” a las microondas como puede ser el Cl_4C , el hexano o el tolueno. Al aumentar la temperatura del medio, se rompen las estructuras celulares que contienen a la esencia por efecto de su presión de vapor. La esencia es así liberada y disuelta en el disolvente presente en el medio. La principal ventaja de esta técnica es su

velocidad, pues pueden lograrse extracciones en minutos, cuando comparativamente una técnica tradicional como la hidrodestilación necesita varias horas^[5].

La implementación del sistema de microondas a escala industrial, si bien es factible tecnológicamente, implica una fuerte inversión económica. Además, debe tenerse en cuenta que, como en cualquier cambio de las tecnologías tradicionales, los productos obtenidos suelen diferir en calidad de los normalmente ofrecidos en el mercado internacional y pueden por lo tanto significar un problema para competir con el producto comercialmente consagrado^[5].

Extracción con fluidos en estado supercrítico

El principio básico de esta técnica se basa en el cambio de propiedades de transporte y de solubilidad que presenta un solvente en este estado. Para el caso de dióxido de carbono como fluido en estado supercrítico dos factores compiten en la influencia de la solubilidad de los solutos. Al incrementar la temperatura se incrementa la presión de vapor del soluto y por lo tanto su solubilidad; Sin embargo simultáneamente a un incremento en la temperatura se disminuye la densidad del CO₂ con lo cual tiende a decrecer la solubilidad del soluto; Conforme la presión se incrementa por encima del punto crítico del dióxido de carbono (7.38 MPa), la densidad del fluido se vuelve menos dependiente de la temperatura y la presión de vapor del soluto se vuelve dominante, de manera que la solubilidad del soluto se incrementa con la temperatura^[5].

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 fluido en estado supercrítico (por ejemplo CO₂), las esencias son así solubilizadas y arrastradas y el fluido supercrítico, que actúa como solvente extractor, se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente finalmente se obtiene una esencia cuyo grado de pureza depende de las condiciones de extracción. Aunque presenta varias ventajas como alto

rendimiento, 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 necesitan bombas de alta presión y sistemas de extracción también resistentes a las altas presiones^[5].

3.3.6 Análisis de la composición de los aceites esenciales.

Los aceites esenciales son mezclas que pueden llegar a ser muy complejas, por lo que la identificación de sus componentes no es una tarea simple; Anteriormente, esta identificación se convertía en una larga y tediosa operación, que consumía muchísimo tiempo, ya que requería el aislamiento y purificación de cada componente (utilizando, por ejemplo, cromatografía en capa fina, cromatografía en columna, destilación fraccionada, etc) y su posterior determinación estructural por métodos tradicionales (obtención de derivados, reacciones de coloración, pruebas de grupos funcionales, etc)^[5].

En las últimas décadas, el desarrollo de técnicas instrumentales de análisis y su acoplamiento a sistemas informáticos y bases de datos, ha cambiado sustancialmente el panorama, agilizando de forma notable la identificación de los componentes de las esencias, han contribuido especialmente a este cambio, el desarrollo de técnicas como:

- Técnicas cromatográficas de alta resolución, principalmente la cromatografía de gases con columnas capilares.
- Técnicas espectroscópicas, particularmente la espectrometría de masas (EM), la espectroscopia infrarroja (IR) y la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN).
- Sistemas cromatográficos acoplados a técnicas espectroscópicas, especialmente la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG-MS) y la cromatografía de gases acoplada a la espectroscopia infrarroja (CG-FTIR)^[5].

Cromatografía en fase gaseosa

La cromatografía de gases es una técnica de separación basada principalmente en fenómenos de partición entre una fase móvil gaseosa (helio, argón, hidrógeno, nitrógeno) y una fase estacionaria constituida por un líquido muy viscoso retenido en el interior de una columna cromatográfica. La columna se coloca en un horno con temperatura regulable y programable, lo que nos permite influir de forma decisiva en la separación de los componentes de la mezcla. El cromatógrafo se completa con un sistema de inyección, que nos permite introducir la muestra en la columna y un detector que muestra las diferentes sustancias a medida que van saliendo de la columna, una vez separadas. Las columnas cromatográficas utilizadas actualmente son de tipo capilar: están constituidas por un tubo de cuarzo flexible de diámetro muy pequeño (normalmente 0.25 mm) y muy largo (25 a 60 m, hasta 200 m); proporcionan alta resolución y permiten separar las mezclas multicomponentes de sustancias de diversa polaridad y/o peso molecular (monoterpenos, sesquiterpenos, etc)^[5].

Para la identificación de los componentes del aceite esencial mediante CG se ha utilizado frecuentemente la comparación de sus tiempos de retención (tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la aparición del pico cromatográfico) con los de los patrones. Sin embargo, los tiempos de retención están fuertemente influenciados por numerosas variables, como la técnica de inyección, las variaciones de temperatura o flujo de los gases, es diseño de equipo, etc. Por este motivo ha sido necesario la introducción de parámetros relativos como son los tiempos de retención relativos y los índices de retención. La identificación de los componentes del aceite se realiza a través de comparación de los índices de retención de las sustancias patrones en dos fases estacionarias, polar y apolar, con los índices obtenidos para los componentes del aceite esencial^[5].

Cromatografía en fase gaseosa acoplada a espectrometría de masas

Durante las dos últimas décadas se ha demostrado que uno de los métodos más eficientes para el estudio de la composición de los aceites esenciales es la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG-EM). Es un método muy adecuado para la identificación debido a que los componentes del aceite son compuestos volátiles y de bajo peso molecular. La esencia se inyecta directamente en el cromatógrafo, sin ningún tratamiento previo, lo cual elimina posibles modificaciones en la composición de la muestra o en la estructura de sus constituyentes debidas a pretratamiento. No se eliminan las alteraciones debidas a la temperatura de análisis, que puede afectar componentes termosensibles. En el cromatógrafo, los componentes de la esencia se separan, tras lo cual penetran en el espectrómetro de masas, que permite registrar el correspondiente espectro de cada una de las sustancias separadas. Los constituyentes del aceite esencial se identifican gracias a los diferentes patrones de fragmentación que se observan en sus espectros de masas^[5].

La CG-EM permite realizar en una sola operación, para una muestra del orden de 1 μ L, un análisis cualitativo junto con una indicación de las proporciones en las que se encuentran componentes. Cuando se dispone de sustancia patrón, la calibración del equipo permite un análisis cuantitativo exacto de la muestra^[5].

Es posible determinar índices de retención en el CG-EM, pero estos pueden no ser comparables con los bibliográficos, que generalmente se han obtenido con cromatógrafos no acoplados a un espectrómetro^[5].

Espectrometría de masas

La identificación de los componentes de los aceites esenciales se realiza con base en sus espectros de masas (EM), obtenidos por impacto electrónico y/o por ionización química.

Varios analizadores másicos (magnético, cuadrupolar, de trampa iónica) se utilizan en espectrómetros de masas acoplados a cromatógrafos de gases. En los últimos años los detectores de trampa iónica se emplean cada vez con más frecuencia en los estudios de mezclas complejas, incluyendo los aceites esenciales, sobre todo cuando se requiere alta sensibilidad en los análisis. En un espectro de masas, se observa, en abscisas, la relación masa/carga (m/z) de los iones formados al fragmentarse la molécula y en las ordenadas, la intensidad (abundancia) de cada uno de los iones formados. Dado que la carga suele ser unitaria, m/z corresponde generalmente a la masa de los fragmentos iónicos^[5].

Las masas de los iones formados a partir de los terpenos, principales constituyentes de los aceites esenciales, son bastante parecidas. Sin embargo difieren en su abundancia lo cual permite su identificación^[5].

Otras técnicas instrumentales de análisis

Cromatografía de gases multidimensional, cromatografía en fase gaseosa acoplada a espectroscopia infrarroja y espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)^[5].

Combinación de técnicas y otros recursos

La identificación de un componente de un aceite esencial mediante una sola técnica de las descritas no suele considerarse suficientemente fiable. Normalmente se combinan varias de ellas, para que una sustancia se considere correctamente identificada deben haberse obtenido resultados coherentes con esa identificación en un mínimo de dos técnicas, empleando, en el caso de la cromatografía de gases, dos columnas de distinta polaridad^[5].

La combinación más frecuentemente utilizada es el análisis del aceite esencial por CG para determinación de los índices de retención y por CG-EM para el registro de los espectros de masas^[5].

3.3.7 Propiedades fisicoquímicas de los aceites esenciales

El control de calidad de un aceite esencial tiene como objetivo garantizar que posea unas determinadas características analíticas y que éstas se mantengan de un lote de producción a otro. A través de un análisis se puede evaluar:

- El cumplimiento con normas de calidad.
- La detección de adulteraciones: por ejemplo el agregado de diluyentes, u otros casos como el agregado de mentol a esencias naturales de mentas, o el de terpenos críticos a la esencia de limón.
- Discriminación de calidades: como puede ser diferenciar una esencia de Geranio de Reunión de una de origen africano.
- Normalización de calidades: como la estandarización de una esencia de menta por mezclado de distintas partidas con diferentes calidades.
- Determinación de que el producto es realmente natural.

Las características estudiadas deben ser suficientemente descriptivas del producto para que permitan detectar aquellas desviaciones que se consideren suficientes para rechazar el lote. Se utilizan diferentes parámetros analíticos y los valores obtenidos para una muestra se comparan con los establecidos en la correspondiente norma, que habrá sido dictada por algún organismo de normalización o, en su defecto, por el propio interesado^[5].

Parámetros analíticos empleados en el control de calidad de aceites esenciales.

Los parámetros analíticos empleados en el control de calidad de aceites esenciales se clasifican en seis tipos, que van desde las características organolépticas hasta las características espectroscópicas, pasando por la determinación de constantes físicas e índices químicos y el estudio del perfil cromatográfico, que incluirá la determinación cuantitativa de los principales componentes^[5].

Tabla 2. Parámetros analíticos empleados en el control de calidad de aceites esenciales^[5].

Descripción	Parámetros
1. Características organolépticas	<ul style="list-style-type: none"> • Olor
2. Determinaciones físicas	<ul style="list-style-type: none"> • Color • Apariencia
3. Índices químicos	<ul style="list-style-type: none"> • Densidad • Poder rotatorio • Índice de refracción • Miscibilidad en etanol • Punto de congelación • Punto de inflamación • Rango de destilación
4. Características cromatográficas	<ul style="list-style-type: none"> • Índice de acidez • Índice de éster • Índice de saponificación • Índice de acetilo • Índice de fenoles
5. Características espectroscópicas	<ul style="list-style-type: none"> • Perfil cromatográfico por CG • Cuantificación de los principales componentes
6. Otras determinaciones	<ul style="list-style-type: none"> • Ultravioleta – visible • Infrarrojo • Pesticidas • Metales pesados

a. Características organolépticas

Las características a tener en cuenta en este apartado son el olor, el color, y la apariencia. El primero de ellos reviste especial importancia, ya que muchos usos de los aceites esenciales se relacionan con el olor^[5].

b. Determinaciones físicas

Se trata principalmente de la determinación de constantes físicas, entre las que se destacan la densidad, el índice de refracción y el poder rotatorio.

La densidad puede determinarse con un picnómetro, o un densímetro electrónico. Debe indicarse la temperatura de trabajo (normalmente 20°C). Casi todas las esencias poseen una densidad menor que el agua.

El índice de refracción puede determinarse mediante un refractómetro electrónico y suele medirse también a 20°C, o de lo contrario se realiza una corrección por diferencia de temperatura. Este parámetro tiene interés para detectar adulteraciones y sus principales ventajas son la rapidez y sencillez con que pueden obtenerse.

Los componentes de los aceites esenciales con frecuencia son ópticamente activos, siendo un isómero óptico el que predomina. Por esta razón, la determinación del poder rotatorio puede ser de gran utilidad para la detección de adulteraciones o falsificaciones.

La miscibilidad en etanol se estudia en alcohol de determinada graduación. Este se va añadiendo a razón de 0,5 ml sobre una muestra de 1 ml de esencia, observando el comportamiento de esta última. Según la Farmacopea Europea, para un alcohol de una graduación dada, el aceite esencial puede ser soluble, soluble con enturbiamiento al diluir, soluble con enturbiamiento entre n1 y n2 volúmenes, o bien soluble con opalescencia. La solubilidad de las esencias en alcohol da una idea de su contenido en monoterpenos: cuanto mayor sea la solubilidad, menor será el contenido de éstos en la esencia, o mayor será su contenido de compuestos oxigenados, como alcoholes y fenoles. Es además, una técnica muy sencilla para detectar adulteraciones provocadas por el agregado de aceites vegetales o minerales, que son insolubles en alcohol.

La determinación del punto de congelación, puede ser reflejo de la calidad de un aceite esencial.

El punto de inflamación tiene importancia para el transporte de este tipo de materias, en relación con su peligrosidad, este parámetro tiene exclusivamente un valor relativo, no tiene influencia sobre la calidad del producto en sí, las normas de calidad no suelen exigir su determinación.

El rango de destilación suele usarse para determinar la volatilidad de la esencia. Se controla la temperatura mínima a la cual comienza a destilar la esencia, y la temperatura máxima a la cual se destila su totalidad. También puede indicarse qué porcentajes destilan a determinados rangos de temperaturas^[5].

c. Índices químicos y otras determinaciones químicas

Índice de acidez: se define como el número de miligramos de hidróxido potásico necesarios para neutralizar la acidez contenida en un gramo de aceite esencial.

Índice de éster: se define como el número de miligramos de hidróxido potásico necesarios para saponificar los ésteres contenidos en un gramo de aceite esencial.

Índice de saponificación: es la suma de los dos índices anteriores^[5].

Características cromatográficas

En el control de calidad, la CG se utiliza para obtener el perfil cromatográfico y cuantificar los principales componentes del aceite esencial, es decir los mayoritarios o aquellos que, sin ser mayoritarios, tengan una especial tendencia para la calidad (responsabilidad en las propiedades olfativas, por ejemplo). El mayor valor de un perfil cromatográfico es permitir, ante la presencia de un componente inusual, o ante la ausencia de un constituyente típico, el rechazo de un aceite esencial^[5].

Características espectroscópicas

Se utilizan principalmente la espectroscopia ultravioleta – visible y la infrarroja. En la espectroscopia infrarroja, el perfil del espectro IR de la esencia puede emplearse como parámetro de calidad en relación a un estándar establecido^[5].

Otras determinaciones

Se supone que muchas esencias deben tener algún grado de contaminación por pesticidas, por la pavorosa difusión de su uso, su alarmante estabilidad ante factores climáticos o metabólicos y su liposubilidad, sin embargo no existen casi antecedentes bibliográficos que permitan conocer qué grado de contaminación poseen, y esto es debido en gran parte a la extrema dilución en que pueden estar presentes y al complejo método de análisis que se requiere para su determinación^[5].

4. METODOLOGÍA

4.1 IDENTIFICACIÓN DE LAS HOJAS Y ESPIGAS DE PIPER ADUNCUM

Tomada una muestra del material a identificar, esta se guarda durante 3 días en refrigeración y posteriormente se somete a un secado con el fin de eliminar los posibles microorganismos que pueda contener y detener su deterioro . La muestra seca se compara con los ejemplares previamente reconocidos que se encuentran en el herbario y de acuerdo a las similitudes que presente se clasifica. Esta caracterización se lleva a cabo en el herbario de la Universidad de Caldas, donde luego del reconocimiento de la planta se obtiene la siguiente información general:

El Piper aduncum que pertenece a la familia de las piperáceas, es un arbusto de 2.5 a 3 metros de altura con ramas pubescentes, oblongolanceoladas, perfectamente acuminadas, peciolo de 0.5 c.m de largo, pubescente.

El material botánico se clasificó de la siguiente manera:

Clase: Dicotiledónea.

Orden: Piperales.

Familia: Piperaceae.

Género: Piper.

Especie: Aduncum L.

4.2 EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE PIPER ADUNCUM

La extracción del aceite esencial de *Piper aduncum* procedente de la zona cafetera, se realizó por medio de dos métodos: hidrodestilación y arrastre con vapor de agua, esto con el

fin de compararlos desde el punto de vista de rendimiento del aceite y calidad del mismo. Inicialmente el procedimiento se realizó en un equipo de vidrio, sin embargo debido a los bajos rendimientos fue necesario cambiarlo por un montaje en el cual fuera posible manipular otras variables para aumentar el rendimiento del aceite.

4.2.1 Diseño experimental.

El diagrama general del diseño experimental es como sigue:

Tabla 3. Diseño experimental

Tiempo de operación (min)	Método 1		Método 2	
	Hojas	Espigas	Hojas	Espigas
60	X	X	X	X
135	X	X	X	X

El número de corridas es igual a:

$$N^{\circ} \text{ de corridas} = 2^2 * 2$$

El estudio se realiza por medio de un diseño experimental al azar de $2^2 * 2$ del cual resultan 8 tratamientos que se realizaron por duplicado.

Las variables que se presentaron en el diseño experimental corresponden al montaje donde se incluyó el manejo de la presión. Para ambos métodos se tienen como variable de respuesta:

- Rendimiento
- Propiedades físicas del aceite obtenido.

Las variables de control fueron:

- Tiempo de extracción 60 minutos.
- Tiempo de extracción 135 minutos

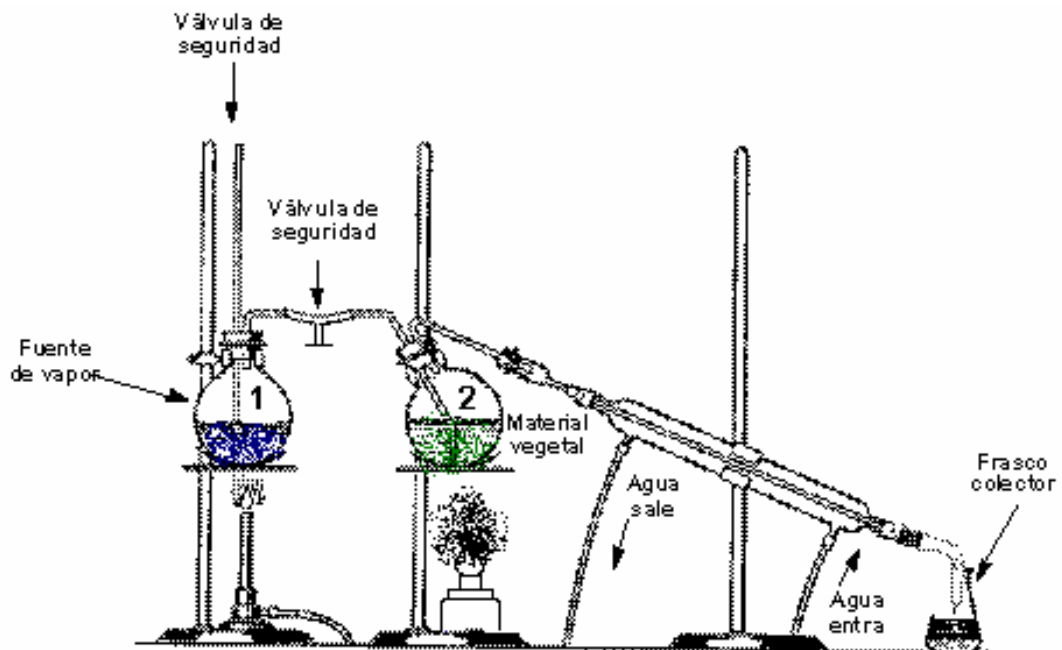
Para la selección de los tiempos de operación se llevó a cabo una etapa pre-experimental, así se evaluó la conveniencia de los tiempos escogidos, el primer tiempo de operación es representativo de la fracción inicial de la extracción (60 minutos) y el segundo representa la fase final de la misma extracción (135 minutos). La selección de estos dos tiempos dio lugar a dos muestras por ensayo realizado.

Las variables fijas fueron establecidas para cada método teniendo en cuenta que las condiciones de operación de cada uno varían, por ejemplo la hidrodestilación no requiere fuente generadora de vapor y el material debe estar inmerso en agua.

4.2.2 Extracción de aceite esencial mediante arrastre con vapor de agua.

Equipo utilizado para el montaje de vidrio

Figura 5. Equipo de extracción por arrastre con vapor de agua en vidrio



Descripción del equipo utilizado:

1. Fuente de vapor: balón de fondo redondo, de 2 litros
2. Cámara extractora: balón de fondo redondo de 10 litros con desprendimiento lateral.
3. La condensación se llevó a cabo en un condensador de bolas de 1 metro de largo

Procedimiento utilizado para la extracción del aceite esencial mediante arrastre con vapor de agua.

Este procedimiento se realizó de manera análoga para hojas y luego para espigas

1. El material vegetal (hojas y espigas) se lavó , se pesaron 500 gramos del material y se cortó en trozos de aproximadamente 2 cm, este material se colocó en la cámara extractora (Figura 5), se agregó agua suficiente para evitar que el material pudiera sufrir daños por quemaduras.
2. Se realizó un precalentamiento del balón que contenía la materia prima para evitar la condensación del vapor procedente del generador de vapor.
3. Se agregaron perlas de ebullición y agua suficiente en el balón generador de vapor, este se calentó hasta ebullición del agua, se revisó que el balón utilizado como extractor no se llenara de agua producto de la condensación del vapor procedente del generador.
4. La práctica se realizó durante 135 minutos, contados después de la obtención de la primera gota de destilado; Se recogieron dos fracciones de destilado la primera a los 60 minutos (fracción de cabeza) y la segunda a los 135 minutos (fracción de cola), después de la recolección de la primera fracción y antes de continuar con la extracción se agitó el contenido del segundo balón con el fin de aumentar el rendimiento de la extracción.
5. Para cada fracción se tomaron los siguientes datos: temperatura del fluido de servicio a la entrada, temperatura del fluido de servicio a la salida, volumen de la fracción de destilado, temperatura del destilado, flujo del destilado.

6. Es de esperarse que el aceite (fase orgánica) se separe del agua en una fase diferente fácilmente visible e identificable. Para los ensayos realizados en el montaje de laboratorio y a presión atmosférica, el destilado obtenido (una emulsión) no presentaba una capa de aceite considerable; estas muestras se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se trataron con 3 tipos diferentes de solventes (cloroformo, éter etílico, éter de petróleo) para tratar de extraer la mayor cantidad de aceite, sin embargo con ninguno de estos el volumen de aceite superó los 0,2 ml (ver tabla 5). Se deduce entonces que el rendimiento del aceite es demasiado bajo, lo que no permite realizar las pruebas de caracterización e identificación del aceite, esto como consecuencia de problemas presentados por el equipo y por el tipo de extracción en general.

Problemas presentados por el equipo de arrastre con vapor de agua en vidrio:

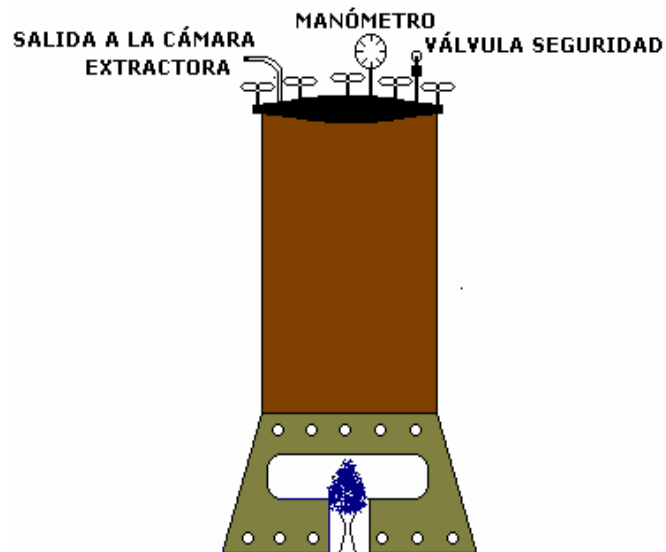
- Como el montaje de laboratorio es de vidrio y no está aislado, las pérdidas de calor a los alrededores son muy altas, lo que hace que el vapor se condense con demasiada facilidad.
- El flujo de vapor producido en el generador no fué adecuado (demasiado bajo) para la cantidad de materia prima utilizada.
- La temperatura del vapor suministrado por el generador era baja, condición que lo hacia fácilmente condensable al entrar en contacto con las paredes del extractor (aunque este fue precalentado) o con el agua contenida en éste y dispuesta para proteger el material vegetal del fuego.
- El material vegetal no se encontraba en contacto directo con el vapor, lo que dificultaba el arrastre de los componentes volátiles.
- La mayoría de los componentes volátiles extraídos del material vegetal quedan atrapados en el balón extractor, debido a la baja temperatura del vapor y a su baja velocidad de producción.
- El contacto del vapor producido en el generador con el agua líquida contenida en el balón extractor aumenta el nivel de condensación, lo que se traduce en un aumento notable del volumen de agua en su interior.

Modificaciones implementadas al equipo de arrastre con vapor de agua en vidrio:

Para solucionar los problemas presentados por el equipo se decidió cambiar el montaje por uno que permitiera manipular la temperatura del vapor a través de la presión; Se concentró la atención en no modificar la esencia del método, tratando de solucionar los problemas descritos:

- Generador de vapor: fue reemplazado por un calderín de dimensiones: Diámetro: 30 cm, altura: 60 cm; cuenta con un manómetro de 0 a 30 psi, una válvula de seguridad y un limnómetro para verificar el nivel del agua contenida en el calderín.

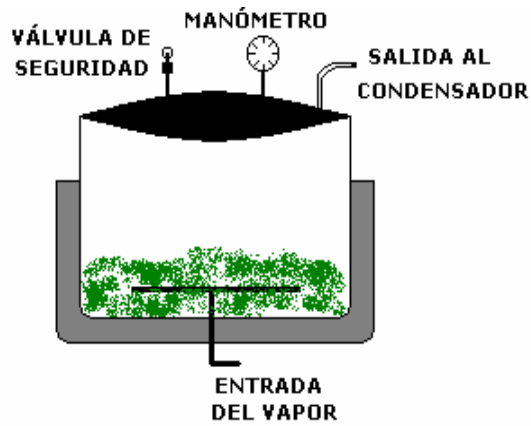
Figura 6. Generador de vapor.



- El balón utilizado para la extracción fue reemplazado por un recipiente a presión, de acero inoxidable, aislado mediante un recubrimiento de fibra de vidrio, con una capacidad de 6 litros, para suministrar el vapor de manera uniforme se adaptó en el fondo del recipiente un anillo de alimentación provisto de agujeros que

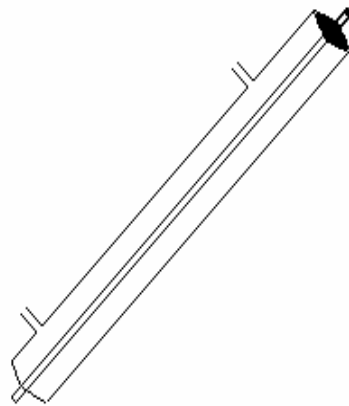
distribuyen el vapor, cuenta además con un manómetro de 0 a 30 psi y una válvula de seguridad.

Figura 7. Cámara de extracción.



- Condensador: se utilizó un tubo de aluminio de 3/8 de pulgada y 1,20 m de largo, una coraza de PVC de 1,5 pulgadas.

Figura 8. Condensador



- Trampa de aceite o separador de fases (vaso florentino): tiene la forma mostrada en la figura 12, el objetivo es que al dejar pasar el condensado, el agua salga por la parte inferior de la manguera y el aceite se quede en la parte superior (diferencia de densidades), sin embargo el aceite era demasiado poco y quedaba adherido a las paredes del embudo y la manguera.

Figura 9. Vaso florentino

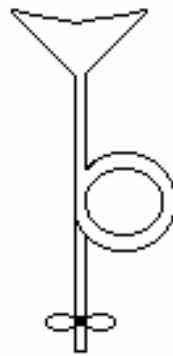
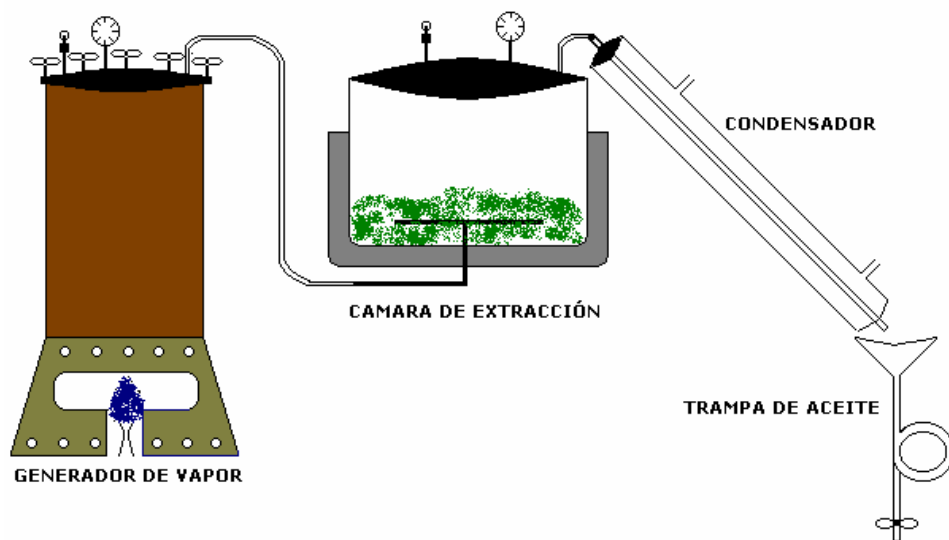


Figura 10. Montaje a presión para arrastre con vapor de agua



Este montaje a diferencia del primero permite la manipulación de la presión.

VARIABLES FIJAS:

1. Cantidad de materia prima: 500 g
2. Presión en la cámara extractora: se manejó un intervalo entre 6 y 7 psi.
3. Presión en el generador de vapor: entre 6 y 7 psi.
4. Cantidad de agua en el calderín: 20 L, agua desionizada y esterilizada.

VARIABLES DE CONTROL:

1. Tiempo de extracción 60 y 135 minutos

VARIABLES DE RESPUESTA:

1. Rendimiento.
2. Propiedades fisicoquímicas del aceite obtenido.

El procedimiento llevado a cabo fue el mismo hasta la carga de la materia prima en la cámara extractora, la operación del equipo después de esto fue como sigue:

- Se comienza el calentamiento en el generador de vapor manteniendo cerrada la llave de paso a la cámara extractora hasta alcanzar en el generador la presión de operación seleccionada (6-7 psi) y aproximadamente 98°C.
- Cuando se alcanza la presión de operación en el generador se permite el paso del vapor a la cámara de extracción, manteniendo cerrada la llave de paso al condensador, esto hasta alcanzar una presión de 7 psi en la cámara.
- Luego de alcanzar la presión de operación en el generador y después de unos minutos de mantenerse el generador y la cámara a la misma presión se abre la llave de paso al condensador, permitiendo entonces la salida de los componentes volátiles de la planta arrastrados por el vapor.

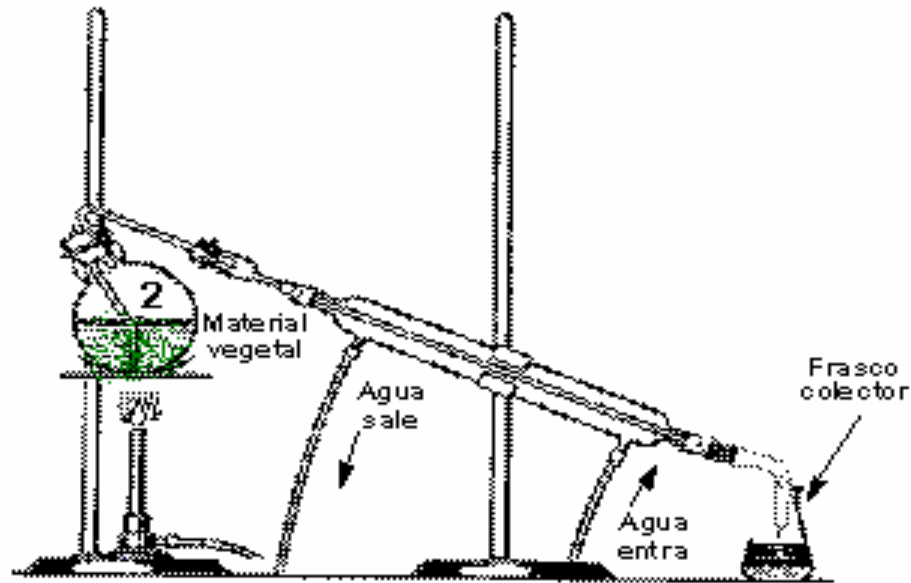
- La práctica se llevó a cabo durante 135 minutos contados después de la obtención de la primera gota de destilado, se recogieron dos fracciones representativas de producto de cabeza y cola (60 y 135 minutos), para cada una de las cuales se tomaron los siguientes datos: temperatura y presión en el calderín, presión en la cámara de extracción, volumen del destilado, temperatura del destilado, temperatura de entrada y salida del agua de servicio, caudal del destilado, caudal del agua a la salida del condensador.
- El destilado se recolectó en frascos que se mantuvieron refrigerados y en reposo durante 24 horas, después se separó la fase orgánica (ahora visible) utilizando una jeringa de 2 ml, el aceite se almacenó en frascos color ámbar y se agregó Sulfato de sodio anhidro como secante, se almacenó para análisis fisicoquímico y cromatográfico.

4.2.3 Extracción Del Aceite Esencial Mediante Hidrodestilacion

El principio de la destilación con agua (hidrodestilación) es llevar a estado de ebullición una suspensión acuosa de un material vegetal aromático, de tal manera que los vapores generados se puedan condensar y colectar. En este método el vapor de agua se genera en el mismo espacio donde se deposita el material vegetal es decir, no se requiere un generador de vapor externo.

Equipo utilizado para el montaje de vidrio

Figura 11. Equipo de extracción en vidrio para hidrodestilación.



Descripción del equipo utilizado:

1. Cámara extractora: balón de fondo redondo, de 10 litros.
2. Condensador: de vidrio y bolas de 1 metro de largo.

Procedimiento utilizado para la extracción del aceite esencial mediante hidrodestilación.

1. Recolección de la materia prima: además de las especificaciones ya mencionadas, en el momento de la recolección se descartaron las plantas ubicadas a borde de carretera, para evitar la contaminación del aceite esencial con metales pesados.
2. El material vegetal previamente lavado y cortado en trozos de aproximadamente 2 cm, es sumergido totalmente en agua al interior de la cámara extractora.
3. Se realizó el montaje mostrado en la figura 11.

4. La práctica se realizó durante 135 minutos, contados después de la obtención de la primera gota de destilado, se recogieron dos fracciones de destilado, la primera a los 60 minutos (fracción de cabeza) y la segunda a los 135 minutos (fracción de cola), se agitó el contenido del segundo balón con el fin de aumentar el rendimiento de la extracción.
5. Para cada fracción se tomaron los siguientes datos: temperatura del fluido de servicio a la entrada, temperatura del fluido de servicio a la salida, volumen de la fracción de destilado, temperatura del destilado, flujo del destilado.
6. Es de esperarse que el aceite (fase orgánica) se separe del agua en una fase diferente fácilmente visible e identificable; Para los ensayos realizados en el montaje de laboratorio y a presión atmosférica, el destilado obtenido (una emulsión) no presentaba una capa de aceite considerable, estas muestras se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se trataron con 3 tipos diferentes de solventes (cloroformo, éter etílico, éter de petróleo) para tratar de extraer la mayor cantidad de aceite;

Problemas presentados por el equipo:

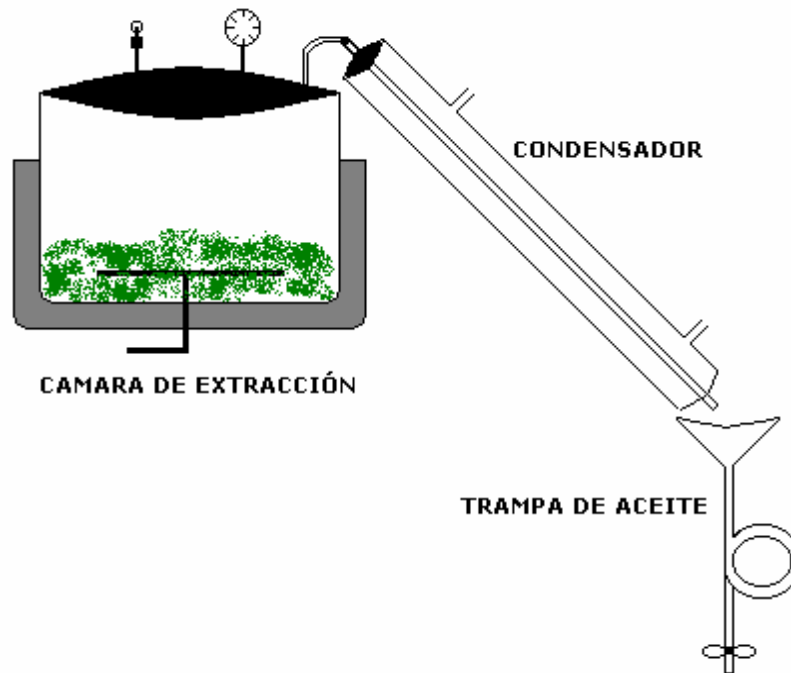
Aunque el rendimiento fue algo mayor que en el primer método, arrastre con vapor de agua, el aceite obtenido no fue suficiente para llevar a cabo las pruebas de laboratorio necesarias. A continuación se explican los principales problemas presentados por el equipo utilizado para la extracción mediante hidrodestilación:

- En este método el material vegetal está inmerso en agua, al no suministrarse calor de manera uniforme el vapor producido por la ebullición del agua en la que se encuentra inmerso el material forma acanalamiento es decir, el vapor busca siempre las mismas salidas formando canales en el material, fácilmente visibles, dejando parte del material sin contacto con éste.
- El calentamiento suministrado a la cámara extractora no es lo suficientemente fuerte para que el vapor producido arrastre los compuestos volátiles de la planta.

Modificaciones realizadas:

El montaje que presenta las soluciones a estos problemas se esquematiza como sigue.

Figura 12. Montaje a presión para extracción de aceite esencial mediante hidrodestilación



Variables fijas:

1. Cantidad de materia prima: 500 g
2. Presión en la cámara extractora: se manejó un intervalo entre 6 y 7 psi.
3. Cantidad de agua en la cámara extractora: 4 L, agua desionizada y esterilizada

Variables de control:

1. Tiempo de extracción 60 y 135 minutos

VARIABLES DE RESPUESTA:

1. Rendimiento.
2. Propiedades fisicoquímicas del aceite obtenido.

la operación del equipo fue la siguiente:

- Después de tener la materia prima cargada en la cámara se suministró calor hasta alcanzar una presión de 7 psi, manteniendo cerrada la llave de paso al condensador.
- Una vez alcanzado este valor se abre la llave que permite el paso de los vapores al condensador.
- La práctica se llevó a cabo durante 135 minutos, se recogieron dos fracciones de destilado representativas de productos cabeza y cola, para las dos fracciones se tomaron datos de presión en la cámara, temperatura del agua de servicio a la entrada y a la salida del condensador, temperatura, caudal y volumen del destilado, y caudal del agua que sale del condensador.
- El destilado se recolectó en frascos que se mantuvieron refrigerados y en reposo durante 24 horas, después se separó fase orgánica (ahora visible) utilizando una jeringa de 2 ml, el aceite se almacenó en frascos color ámbar y se agregó Sulfato de sodio anhidro como secante, se procedió con las prácticas de laboratorio.

En el anexo D pueden verse las fotografías de los montajes modificados para ambos métodos.

4.3 EVALUACION DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL ACEITE

Para el aceite obtenido en cada uno de las fracciones se evaluaron densidad e índice de refracción (tabla 5), las demás pruebas fisicoquímicas (rotación óptica y punto de

ebullición) requerían una cantidad de aceite superior a 1ml, el cual no se obtuvo para ninguna de las fracciones como puede verse en la tabla 5. El aceite obtenido fue destinado para pruebas cromatográficas y para las fisicoquímicas que no requerían más que una pequeña cantidad de aceite. Los procedimientos realizados para determinar estas propiedades se muestran en el Anexo E.

4.4 IDENTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES COMPONENTES DEL ACEITE ESENCIAL DE PIPER ADUNCUM

Para el aceite esencial obtenido fueron realizadas pruebas de identificación; aunque inicialmente se propuso realizar cromatografías de gases, se realizó GC/MS a una mayor cantidad de muestras, ya que esta prueba es mucho más precisa y cuantificable.

Utilizando la técnica cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas se identificaron los componentes mayoritarios de las muestras obtenidas durante la extracción utilizando el software wsearch32. Este programa compara el patrón obtenido en la GC/MS de la sustancia problema con patrones teóricos de las sustancias más parecidas y mediante la diferencia de las gráficas entre estos, convertidas en probabilidad, se determina cuál es el compuesto; Este programa permite además calcular las áreas bajo cada pico, lo que se traduce en el porcentaje del compuesto en la muestra problema. A partir del cromatograma de masas se calcula la masa exacta de cada compuesto en la muestra.

Se analizaron los picos más representativos del cromatograma, de acuerdo a su altura, resolución y tamaño.

Las pruebas fueron realizadas en el laboratorio de Análisis Instrumental de la Universidad de Antioquia, utilizando un equipo Hewlett Packard con una columna capilar de 30 m * 0,5 mm, equipada con un detector split con inyección manual, las condiciones de corrida fueron:

Gas de arrastre: Helio.

Velocidad del gas de arrastre: 32 cm/s.

Temperatura del inyector: 250°C.

Temperatura de la interfase: 250°C.

Arranque del horno: 75°C durante 4 minutos, la temperatura debe subir hasta 200°C a una razón de 3°C/mi, cuando la temperatura alcanza un valor de 200°C, debe permanecer allí 8 minutos.

Preparación de la muestra: se realizan diluciones en diclorometano en relación 10:1.

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1 PROPIEDADES FÍSICAS DEL ACEITE ESENCIAL DE PIPER ADUNCUM

Tabla 4. Propiedades físicas del aceite esencial de Piper aduncum.

Aceite Esencial	Propiedades
Apariencia	Líquido claro, aceitoso.
Color	Amarillo pálido, transparente
Olor	Picante
Densidad	Entre 1,708 y 1,4553
Índice de refracción	Entre 1,5015 y 1,5242
Solubilidad en:	
Agua	Insoluble
Alcohol	Insoluble
Cloroformo	Soluble
Eter etílico	Soluble
Eter de petróleo	Soluble

Las propiedades determinadas se ajustan a los valores reportados en estudios previos del aceite esencial de *Piper Aduncum*^{[5],[7]}. La diferencia entre las densidades esperadas y las obtenidas durante los ensayos pueden deberse al método de medida sin embargo era completamente visible que el aceite obtenido presentaba una densidad mayor a la del agua. La insolubilidad presentada por el aceite en alcohol indica que la esencia tiene gran cantidad de monoterpenos como la piperitona y el fenaldreno y sesquiterpenos como el cariofileno y germacreno-d entre otros.

5.2 RESULTADOS DE LA EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE PIPER ADUNCUM

En la tabla 5 se muestran los resultados de rendimientos con base en la cantidad de materia prima fresca y el índice de refracción obtenidos para cada una de las fracciones obtenidas en las extracciones; Se reportan únicamente 8 datos pues los realizados para las réplicas no presentaron variaciones significativas.

Tabla 5. Resultados de la extracción del aceite esencial de Piper aduncum.

Muestra	Densidad (g/ml)	ml aceite/g m.p*	%Rendimiento g aceite/g mp*	Índice de refracción
1	1,3387	0,00062	0,0830	1.5080
2	1,4553	0,00060	0,0873	1.5232
3	1,4527	0,00030	0,0436	1.5095
4	1,8450	0,00025	0,0471	1.5204
5	1,0708	0,00680	0,7281	1.5015
6	1,0884	0,00100	0,1088	1.5160
7	1,0746	0,02000	2,1493	1.5064
8	1,0782	0,01560	1,6819	1.5242

mp*: materia prima: hojas o espigas.

Tabla 6. Rendimientos en base a la cantidad de materia prima fresca por ensayo realizado.

Ensayo	Densidad (g/ml)	Ml aceite/g m.p*	%Rendimiento g aceite/g mp*
1	1,3970	0,00127	0,1704
2	1,6489	0,00055	0,0907
3	1,0796	0,00780	0,8421
4	1,0764	0,0356	3,8320

m.p*: materia prima, hojas o espigas.

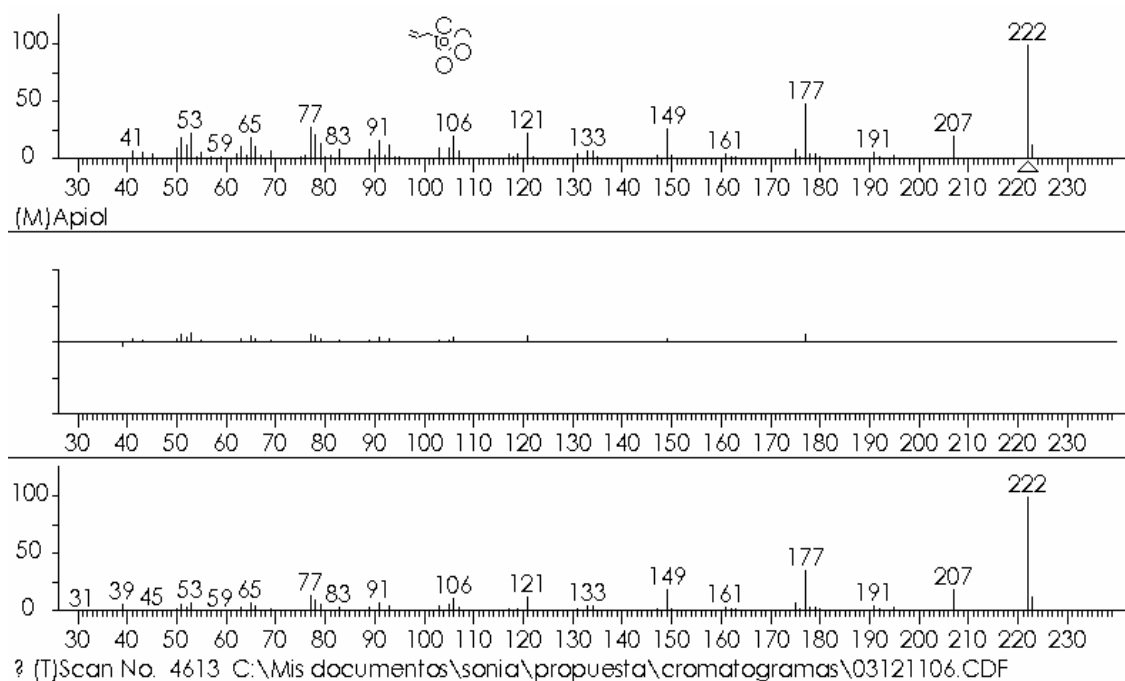
Ver en el anexo C la numeración de los ensayos realizados, de acuerdo al método, parte de la planta y tiempo de extracción.

5.3 IDENTIFICACIÓN QUÍMICA DE LOS COMPUESTOS EN EL ACEITE ESENCIAL DE PIPER ADUNCUM

Esta identificación se realiza por comparación. Se pueden observar tres espectros: el primero corresponde al teórico del compuesto que el software selecciona como identificación, el tercero es el correspondiente al pico de la muestra y el segundo representa la diferencia entre estos dos, entre menor sea la diferencia mayor es la probabilidad que el compuesto identificado corresponda con el seleccionado por el software.

Como ejemplo se muestra en la figura 13 uno de los picos mas representativos de la muestra número 1 que corresponde al Apiol (con un porcentaje de 47,319%).

Figura 13. Patrones de comparación para el Apiol.



En el anexo F se presentan los resultados cromatográficos de cada una de las 11 muestras analizadas. En las siguientes tablas se reportan los componentes mayoritarios encontrados en cada muestra.

- Muestra 1: Arrastre con vapor, hojas, destilado total.

Tabla 7. Componentes identificados muestra 1.

Compuesto identificado	Tiempo de retención	Altura del pico	Área del pico	Porcentaje del compuesto en la muestra
Apiol	31.992	3624018	1014627173	47.319
Germacreno D	26.046	4726563	463156801	21.6
Gama Elemeno	26.579	3175848	166677886	7.773
Cariofileno	23.421	2945591	129451655	6.037
Miristicina	27.555	1621950	84921961	3.96

- Muestra 2: Arrastre con vapor de agua, hojas, 135 minutos.

Tabla 8. Componentes identificados: muestra 2

Compuesto identificado	Tiempo de retención	Altura del pico	Área del pico	Porcentaje del compuesto en la muestra
Apiol	33.01	8344941	263558694	47.706
Beta Cubebeno	21.09	6026776	84414008	15.279
Cariofileno	24.33	4157709	52308179	9.468
Gama Elemeno	27.41	2794407	28595607	5.176
Miristicina	33.01	8344941	263558694	5.034

- Muestra 3: Arrastre con vapor, espigas, 60 minutos.

Tabla 9. Componentes identificados muestra 3.

Compuesto identificado	Tiempo de retención	Altura del pico	Área del pico	Porcentaje del compuesto en la muestra
Apiol	31.717	3376796	531642988	70.664
Germacreno D	25.901	2204436	93378159	12.411
Gama Elemeno	26.489	547443	23389307	3.109
Cariofileno	23.360	507138	19374509	2.575
Piperitona	16.405	518720	18547897	2.465

- Muestra 4: Arrastre con vapor de agua, espigas, 135 minutos.

Tabla 10. Componentes identificados muestra 4.

Compuesto identificado	Tiempo de retención	Altura del pico	Área del pico	Porcentaje del compuesto en la muestra
Apiol	35.14	24111762	1682358042	19.238
Germacreno D	27.57	18725155	1649002704	18.856
Cariofileno	24.52	13400454	588716941	6.732
Copaeno	22.49	8762335	176458771	2.018

- Muestra 5: Hidrodestilación, hojas, 60 minutos.

Tabla 11. Componentes identificados muestra 5.

Compuesto identificado	Tiempo de retención	Altura del pico	Área del pico	Porcentaje del compuesto en la muestra
Apiol	32.031	3684969	1118177405	54.456
Germacreno D	26.007	4446472	355461806	17.311
Cariofileno	23.410	2538203	104711348	5.1
Gama Elemeno	26.546	1932271	88730449	4.321
Miristicina	27.527	8884361	36387195	1.772

- Muestra 6: Hidrodestilación, hojas, 60 minutos.

Tabla 12. Componentes identificados muestra 6.

Compuesto identificado	Tiempo de retención	Altura del pico	Área del pico	Porcentaje del compuesto en la muestra
Apiol	31.627	3243217	314189206	78.712
Germacreno D	25.878	1152621	44010764	11.026
Cariofileno	23.360	273467	10388755	2.603
Gama Elemeno	26.478	212540	8688445	2.177
Miristicina	27.465	124744	4894921	1.226

- Muestra 7: hidrodestilación, hojas, 135 minutos.

Puede observarse el cromatograma para la muestra número 7 (anexo F), no presentó picos representativos correspondientes a los compuestos generales del *Piper aduncum*, los compuestos presentados (Nonanal, tiempo de retención: 11:01min; 2-decenal tiempo de retención: 17:46min; 2-undecenal tiempo de retención: 22:07min) pueden ser producto de la degradación del aceite, causado por un aumento en la presión^[15]. Sin embargo se identificó el Apiol en un tiempo de retención de 32:37 minutos, en un pico muy pequeño con un porcentaje aproximado de 1,61%, fue imposible determinar los demás compuestos.

- Muestra 8: Hidrodestilación, espigas, 60 minutos.

Tabla 13. Componentes identificados muestra 8.

Compuesto identificado	Tiempo de retención	Altura del pico	Área del pico	Porcentaje del compuesto en la muestra
Apiol	31.952	3660092	1016906272	57.337
Piperitona	16.606	4461527	436456326	24.609
Miristicina	27.521	1366295	62609186	3.530
Germacreno D	25.872	1231873	49241574	2.776
linalol	10.033	1379659	43956041	2.478

- Muestra 9: Hidrodestilación, espigas, 60 minutos.

Tabla 14. Componentes identificados muestra 9.

Compuesto identificado	Tiempo de retención	Altura del pico	Área del pico	Porcentaje del compuesto en la muestra
Apiol	32.222	3855545	1571844607	57.725
Piperitona	16.663	4852656	571326695	20.982
Miristicina	27.572	2539741	128910388	4.734
Germacreno D	25.912	2493068	109202721	4.010
Beta Pineno	7.554	1992586	77380362	2.842

- Muestra 10: Hidrodestilación, espigas, 60 minutos.

Tabla 15. Componentes identificados muestra 10.

Compuesto identificado	Tiempo de retención	Altura del pico	Área del pico	Porcentaje del compuesto en la muestra
Apiol	32.351	4017354	1954066488	54.486
Piperitona	16.696	5099974	739383329	20.616
Miristicina	27.589	2975507	183810004	5.125
Germacreno D	25.928	3062265	155749120	4.343
Beta Pineno	7.559	2640514	107269774	2.991

- Muestra 11: Hidrodestilación, espigas, 135 minutos.

Tabla 16. Componentes identificados muestra 11.

Compuesto identificado	Tiempo de retención	Altura del pico	Área del pico	Porcentaje del compuesto en la muestra
Apiol	35.22	13101917	582691341	11.404
Piperitona	17.53	8609632	356105262	6.970
Germacreno D	27.28	9703318	111407829	2.180
Copaeno	22.44	5196074	70164477	1.373
Beta	8.19	4330092	50491992	0.987
Fenaldreno				

5.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

En las tablas de resultados se muestran los 8 ensayos originales, las réplicas fueron reproducidas bajo las mismas condiciones de operación (ver Anexos A y B), los resultados para estas no son mostrados pues no presentaron variaciones significativas. A continuación se presenta una prueba de medias para las variables de respuesta.

Pruebas de comparación de medias y desviaciones estándar para las variables de respuesta medidas en el ensayo original y en su réplica.

- **Rendimiento**

Comparación de medias:

Ho: no existe diferencias de medias entre los valores de ensayo y réplica.

Hi: existe diferencias de medias entre los valores de ensayo y réplica.

Con un 95% intervalo de confianza:

para media del rendimiento original: $0,534225 \pm 0,720622$ $[-0,186397; 1,25435]$

para media del rendimiento réplica: $0,533825 \pm 0,720268$ $[-0,186443; 1,25409]$

para la diferencia entre medias: asumiendo varianza igual:

$$0,0004 \pm 0,92415 \quad [-0,92374; 0,92454]$$

asumiendo varianza igual: valor $p = 0,999272$

como el valor p es mayor que 0.005 se acepta la hipótesis nula, según la cual no existe diferencias significativas entre las medias de las muestras.

Comparación de desviaciones estándar:

Con un intervalo de confianza de 95%:

Desviación estándar para el rendimiento original: $[0,569908; 1,75433]$

Desviación estándar para el rendimiento en la réplica: $[0,569628; 1,75347]$

Test de comparación de desviación estándar:

H_0 : las desviaciones estándar son iguales para las dos muestras.

H_1 : las desviaciones estándar son diferentes.

Valor p : $0,999$; es decir se acepta la hipótesis nula según la cual no existe diferencia entre las desviaciones estándar de las dos muestras.

- **Densidad**

Comparación de medias:

Con un intervalo de confianza del 95%:

Para media de la densidad original: $1,29991 \pm 0,233306$ $[1,06661; 1,53322]$

Para media de la densidad en la réplica: $1,30229 \pm 0,236675$ $[1,06561; 1,53896]$

Para la diferencia entre medias: asumiendo igual varianza:

$$-0,002375 \pm 0,301438 \quad [-0,303813; 0,299063]$$

Test de comparación de medias:

H_0 : las medias de las dos muestras son iguales.

H_1 : las medias de las dos muestras son diferentes.

Asumiendo igual varianza: valor-p: 0,986756. Es decir se acepta la hipótesis nula, según la cual no existe diferencia entre las medias.

Comparación de desviaciones estándar:

	densidad	densrep
Standard deviation	0.279067	0.283096
Variance	0.0778781	0.0801434
Df	7	7

Con un intervalo de confianza de 95%:

Desviación estándar para la densidad original: [0,18412;0,567976]

Desviación estándar para la densidad en la réplica: [0,187176;0,576178]

Test de comparación de la desviación estándar

Ho: la desviación estándar es igual para las dos muestras.

Hi: la desviación estándar es diferente para las dos muestras.

valor p: 0,970802; es decir se acepta la hipótesis nula según la cual las desviaciones estándar son iguales para las dos muestras.

- **Índice de refracción**

Comparación de medias:

Con un intervalo de confianza del 95%:

Para la media del índice de refracción original: 1,51365+/-0,00708629 [1,50656;1,52074]

Para la media del índice de refracción en la réplica: 1,51307+/-0,00738095

[1,50569;1,52046]

Para la diferencia entre medias: asumiendo igual varianza:

0,000575+/-0,00928074 [-0,00870574;0,00985574]

Test de comparación de medias:

Ho: no existe diferencia entre las medias.

Hi: si existe diferencia entre las medias.

Asumiendo varianzas iguales: valor p: 0,28988; como es mayor que 0,05 se acepta la hipótesis nula; lo que significa que no existe diferencia significativa entre las medias.

Comparación de desviación estándar

	IR	IRrep
Standard deviation	0.00847619	0.00882865
Variance	0.0000718457	0.000077945
Df	7	7

Con un intervalo de confianza del 95%:

La desviación estándar para el índice de refracción original: [0,00560423;0,0172513]

La desviación estándar para el índice de refracción en la réplica: [0,00583727;0,0179687]

Test para comparar desviaciones estándar

Ho: la desviación estándar es igual para las dos muestras.

Hi: la desviación estándar es diferente para las dos muestras.

Como valor $p=0,917163$ es mayor que 0,05 se acepta entonces la hipótesis nula, según la cual no existe diferencias entre las desviaciones estándar.

Análisis de la incidencia de los factores sobre la densidad

Estos cálculos se realizaron apoyadas en el paquete estadístico STATGRAPHICS 5.0.

Para estos cálculos se plantearon las siguientes juegos de hipótesis para cada factor:

Factor A: método de extracción

Ho: no existe incidencia del método utilizado sobre la densidad.

H₁: si existe incidencia del método utilizado sobre la densidad.

Factor B: parte de la planta

Ho: no existe incidencia de la parte de la planta utilizada sobre la densidad.

H₁: si existe incidencia de la parte de la planta utilizada sobre la densidad.

Factor C: Tiempo de extracción

Ho: no existe incidencia del tiempo de extracción sobre la densidad.

H₁: si existe incidencia del tiempo de extracción sobre la densidad.

Tabla 17. Análisis de varianza para densidad.

Analysis of Variance for Densidad

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Métodos	0.397877	1	0.397877	39.11	0.1009
B:Partes	0.0314629	1	0.0314629	3.09	0.3292
C:Tiempo	0.0345451	1	0.0345451	3.40	0.3165
AB	0.0319666	1	0.0319666	3.14	0.3270
AC	0.0302703	1	0.0302703	2.98	0.3345
BC	0.00885115	1	0.00885115	0.87	0.5222
Total error	0.0101745	1	0.0101745		
Total (corr.)	0.545147	7			

Como p-valor es > 0.05 entonces se acepta la hipótesis nula y se rechaza la hipótesis alternativa, de donde se puede concluir que ninguno de los factores ni las interacciones entre ellos tienen un efecto significativo sobre la densidad.

Los datos de la variable de respuesta densidad, se sometieron a un ajuste, a continuación se reportan el modelo escogido y los coeficientes de regresión, también se hace una predicción de la densidad usando este modelo.

Regression coeffs. for Densidad

constant	= 0.760513
A:Métodos	= 0.302325
B:Partes	= 0.305125
C:Tiempo	= 0.300925
AB	= -0.25285
AC	= -0.24605
BC	= 0.13305

El modelo encontrado sería entonces:

$$\text{Densidad} = 0.760513 + 0.302325 \cdot \text{Métodos} + 0.305125 \cdot \text{Partes} + 0.300925 \cdot \text{Tiempo} - 0.25285 \cdot \text{Métodos} \cdot \text{Partes} - 0.24605 \cdot \text{Métodos} \cdot \text{Tiempo} + 0.13305 \cdot \text{Partes} \cdot \text{Tiempo}$$

A partir del modelo obtenido pueden tener las predicciones sobre la densidad:

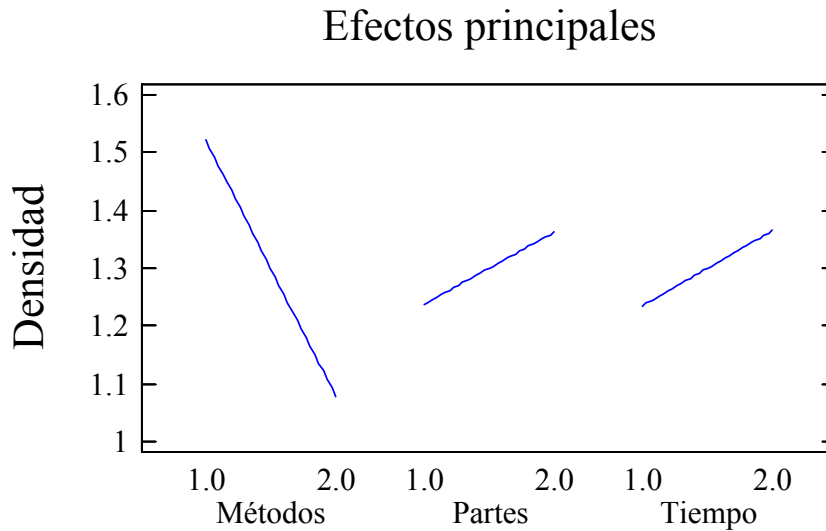
Estimation Results for Densidad

Row	Observed Value	Fitted Value	Lower 95.0% CL for Mean	Upper 95.0% CL for Mean
1	1.3387	1.30304	0.104155	2.50192
2	1.0708	1.10646	-0.0924201	2.30535
3	1.4527	1.48836	0.28948	2.68725
4	1.0746	1.03894	-0.159945	2.23782
5	1.4553	1.49096	0.29208	2.68985
6	1.084	1.04834	-0.150545	2.24722
7	1.845	1.80934	0.610455	3.00822
8	1.0782	1.11386	-0.0850201	2.31275

En el gráfico de los efectos principales puede verse la influencia de cada factor sobre la variable de respuesta, entre mayor sea la pendiente habrá mayor incidencia, una pendiente negativa descarta la influencia del factor sobre la variable de respuesta.

Aunque de acuerdo con el criterio del p-valor ninguno de los factores tiene incidencia sobre la densidad, según la gráfica de los efectos principales puede verse que los factores partes y tiempo son los que tienen mayor influencia.

Figura 14. Efectos principales sobre la densidad.



Análisis de la incidencia de los factores sobre el rendimiento

Análogamente a la densidad, para el rendimiento se plantearon las siguientes hipótesis:

Factor A: método de extracción

Ho: no existe incidencia del método utilizado sobre el rendimiento.

H₁: si existe incidencia del método utilizado sobre el rendimiento.

Factor B: parte de la planta

Ho: no existe incidencia de la parte de la planta utilizada sobre el rendimiento.

H₁: si existe incidencia de la parte de la planta utilizada sobre el rendimiento.

Factor C: Tiempo de extracción

Ho: no existe incidencia del tiempo de extracción sobre el rendimiento.

H₁: si existe incidencia del tiempo de extracción sobre el rendimiento.

Tabla 18. Análisis de varianza para el rendimiento.

Analysis of Variance for Rendimiento					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Métodos	2.42782	1	2.42782	832.97	0.0220
B:Partes	1.06193	1	1.06193	364.34	0.0333
C:Tiempo	0.145503	1	0.145503	49.92	0.0895
AB	1.18111	1	1.18111	405.23	0.0316
AC	0.149741	1	0.149741	51.38	0.0882
BC	0.0028539	1	0.0028539	0.98	0.5034
Total error	0.00291466	1	0.00291466		
Total (corr.)	4.97187	7			

De estos resultados se puede concluir que tanto los métodos de extracción como las partes de la planta tienen influencia directa sobre el rendimiento obtenido, a diferencia del tiempo

de extracción; en cuanto a las interacciones entre los factores, puede concluirse que la combinación método y parte incide en la variable de respuesta mientras las demás interacciones no la tienen..

Los coeficientes de regresión, el modelo obtenido mediante ajuste de los datos y predicciones para el rendimiento son:

Regression coeffs. for Rendimiento

```
-----
constant    = 0.671862
A:Métodos   = -0.382775
B:Partes    = -1.69008
C:Tiempo    = 0.437825
AB          = 1.53695
AC          = -0.54725
BC          = 0.07555
-----
```

La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Rendimiento} = 0.671862 - 0.382775 \cdot \text{Métodos} - 1.69008 \cdot \text{Partes} + 0.437825 \cdot \text{Tiempo} + 1.53695 \cdot \text{Métodos} \cdot \text{Partes} - 0.54725 \cdot \text{Métodos} \cdot \text{Tiempo} + 0.07555 \cdot \text{Partes} \cdot \text{Tiempo}$$

A partir de este modelo se realizaron predicciones del rendimiento.

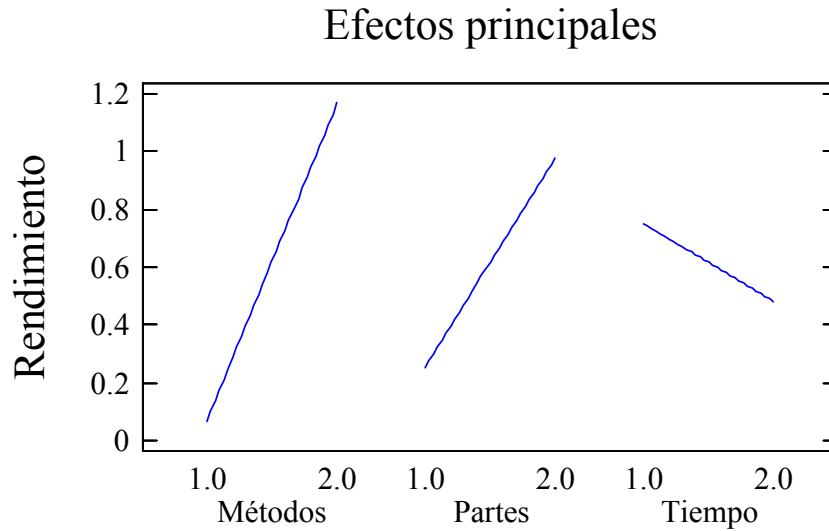
Estimation Results for Rendimiento

```
-----
```

Row	Observed Value	Fitted Value	Lower 95.0% CL for Mean	Upper 95.0% CL for Mean
1	0.083	0.102087	-0.539586	0.743761
2	0.7281	0.709013	0.0673393	1.35069
3	0.0436	0.0245125	-0.617161	0.666186
4	2.1493	2.16839	1.52671	2.81006
5	0.0873	0.0682125	-0.573461	0.709886
6	0.1088	0.127888	-0.513786	0.769561
7	0.0471	0.0661875	-0.575486	0.707861
8	1.6819	1.66281	1.02114	2.30449

```
-----
```

Figura 15. Efectos principales sobre el rendimiento



Según la tendencia de esta gráfica puede observarse que la influencia de los métodos es mayor que la de partes o tiempo sobre el rendimiento. En la tabla 5 pueden compararse los rendimientos obtenidos de acuerdo a los métodos utilizados, el mayor rendimiento se presentó utilizando el método de hidrodestilación (aplicado a espigas).

Análisis de la incidencia de los factores sobre el índice de refracción.

Factor A: método de extracción

Ho: no existe incidencia del método utilizado sobre el índice de refracción.

H₁: si existe incidencia del método utilizado sobre el índice de refracción.

Factor B: parte de la planta

Ho: no existe incidencia de la parte de la planta utilizada sobre el índice de refracción.

H₁: si existe incidencia de la parte de la planta utilizada el índice de refracción.

Factor C: Tiempo de extracción

Ho: no existe incidencia del tiempo de extracción sobre el índice de refracción.

H₁: si existe incidencia del tiempo de extracción sobre el índice de refracción.

Tabla 19. Análisis de varianza para el índice de refracción.

Analysis of Variance for Refracción

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Métodos	0.00042632	1	0.00042632	59.05	0.0824
B:Partes	0.000017405	1	0.000017405	2.41	0.3643
C:Tiempo	0.000021125	1	0.000021125	2.93	0.3368
AB	1.25E-7	1	1.25E-7	0.02	0.9167
AC	0.000004805	1	0.000004805	0.67	0.5644
BC	0.00002592	1	0.00002592	3.59	0.3092
Total error	0.00000722	1	0.00000722		
Total (corr.)	0.00050292	7			

Del análisis de varianza y el valor p puede concluirse que ninguno de los factores ni ninguna interacción entre ellos causa una incidencia directa sobre el índice de refracción.

Coefficientes de regresión para el índice de refracción:

Regression coeffs. for Refracción

constant = 1.51425
A:Métodos = 0.0107
B:Partes = -0.0071
C:Tiempo = -0.0187
AB = -0.0005
AC = 0.0031
BC = 0.0072

La ecuación para el modelo obtenido es:

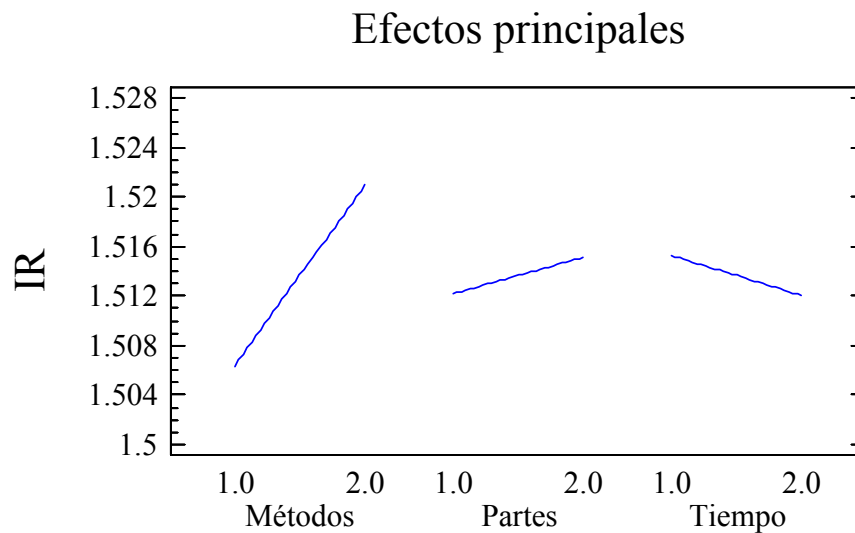
$$\text{Refracción} = 1.51425 + 0.0107 \cdot \text{Métodos} - 0.0071 \cdot \text{Partes} - 0.0187 \cdot \text{Tiempo} - 0.0005 \cdot \text{Métodos} \cdot \text{Partes} + 0.0031 \cdot \text{Métodos} \cdot \text{Tiempo} + 0.0072 \cdot \text{Partes} \cdot \text{Tiempo}$$

Predicciones:

Estimation Results for Refracción

Row	Observed Value	Fitted Value	Lower 95.0% CL for Mean	Upper 95.0% CL for Mean
1	1.508	1.50895	1.47701	1.54089
2	1.5232	1.52225	1.49031	1.55419
3	1.5095	1.50855	1.47661	1.54049
4	1.5204	1.52135	1.48941	1.55329
5	1.5015	1.50055	1.46861	1.53249
6	1.516	1.51695	1.48501	1.54889
7	1.5064	1.50735	1.47541	1.53929
8	1.5242	1.52325	1.49131	1.55519

Figura 16. Efectos principales sobre el índice de refracción

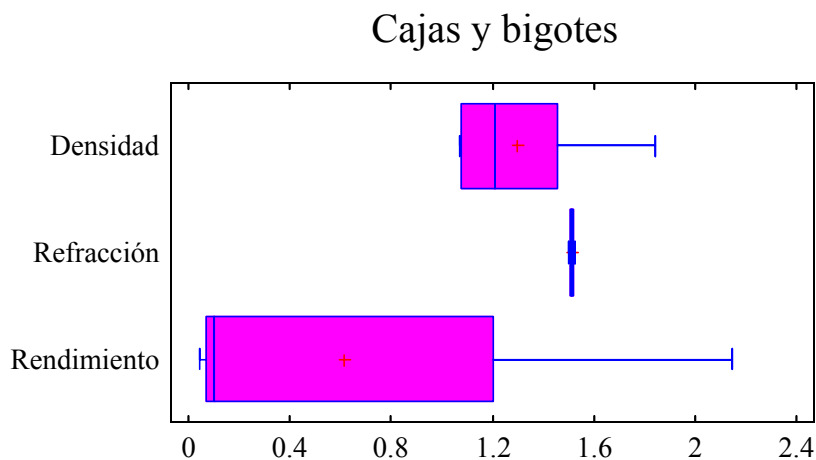


Aunque de acuerdo con el criterio del p-valor ninguno de los factores tiene incidencia sobre el índice de refracción, según la gráfica de los efectos principales puede verse que el factor método es el que tiene mayor influencia.

Gráfico de cajas y bigotes

En esta gráfica puede observarse que para la densidad los datos varían desde 1,0708 a 1,845; para el índice de refracción varía entre 1,5015 a 1,5242; y para el rendimiento entre 0,0435 y 2,1493, en este diagrama puede observarse que tan cercanos o distantes se encuentran los datos.

Figura 17. Gráfica de cajas y bigotes.



5.5 DETERMINACIÓN DE LOS COSTOS DE PRODUCCIÓN DEL ACEITE

Agua total requerida

Para determinar el agua total requerida es necesario calcular el agua del proceso sumada al agua de lavado y el agua de enfriamiento:

$$\text{Agua de proceso} = (\text{Flujo másico de vapor} / \rho_{\text{H}_2\text{O}}) * \text{tiempo}$$

$$= (1,3177 \text{ g/min}) / (1 \text{ g/ml}) * 135 \text{ min}$$

$$= 1527,8895 \text{ ml H}_2\text{O}$$

$$\text{Agua de enfriamiento} = (\text{Flujo másico de agua} / \rho_{\text{H}_2\text{O}}) * \text{tiempo}$$

$$= (37,5 \text{ ml/s}) * (60 \text{ s/min}) * 135 \text{ min}$$

$$= 303750 \text{ ml H}_2\text{O}$$

$$\text{Agua total} = \text{agua de lavado} + \text{agua del proceso} + \text{agua de enfriamiento}$$

$$= 1000 \text{ ml} + 1527,895 \text{ ml} + 303750 \text{ ml}$$

$$= 306277,8895 \text{ ml H}_2\text{O} / 500 \text{ g de materia prima}$$

$$= 612,575 \text{ ml H}_2\text{O} / \text{g materia prima}$$

$$\text{Valor de 1ml de agua} = \$2,865 * 10^{-5}$$

$$\text{Valor de agua total por gramo de materia prima} = \$1,755 * 10^{-2}$$

Gas necesario para el proceso

Para realizar este cálculo es necesario realizar un balance de energía en el generador para determinar el flujo de calor.

$$Q = F * C_p * (T_2 - T_1) + F * \lambda_v$$

$$= (11,3177 \text{ g/min}) * (4,177 \text{ J/g} * \text{K}) * (371,15 - 293,15) \text{ K} + (11,3177 \text{ g/min}) * (2275 \text{ J/g})$$

$$= 29435,1421 \text{ J/min}$$

$$= 1766,1085 \text{ KJ/h}$$

Donde:

Q : flujo de calor en el generador.

F: flujo de vapor de agua en el generador = 11.3177 g/min

Cp: capacidad calorífica del agua líquida = 4.177 J/g*K

λ_v : calor de vaporización del agua a 585 mmHg.

T₁ = temperatura inicial = 20°C = 293,15 K

$T_2 = \text{temperatura final} = 98^\circ\text{C} = 371,15 \text{ K}$

Masa de gas necesario:

$$M_{\text{gas}} = Q \cdot (1/pc) \cdot \rho$$

$$= (29435,1421 \text{ J/min}) \cdot (1\text{ml}/38,89\text{J}) \cdot 0.00058 \text{ g/ml}$$

$$= 3,2518 \cdot 10^{-3} \text{ g gas}$$

Valor de gas = ($\$1,307 \cdot 10^{-5}$) por gramo de materia prima.

Tabla 20. Costo preliminar de producción

CONCEPTO	VALOR/ g MATERIA PRIMA
RECOLECCIÓN	\$1500
TRANSPORTE	\$1500
AGUA	$\$1,755 \cdot 10^{-2}$
GAS	$\$1,307 \cdot 10^{-5}$
TOTAL	3000,0175

Con un rendimiento promedio de 1,2339, se obtiene un valor estimado del aceite de $\$2431,3788/\text{g}$ aceite.

Para estimar el valor comercial que tendría el aceite es necesario realizar pruebas a escala piloto que permitan a través del manejo de más variables (como diferentes presiones, tiempos de extracción, mayor cantidad de materia prima) conocer cual es el máximo rendimiento que puede esperarse, sabiendo a partir de los ensayos a nivel de laboratorio que el método de hidrodestilación proporciona un mayor rendimiento. Un valor aproximado podría obtenerse comparando el precio del aceite obtenido de *Piper Aduncum* con el precio de otra planta perteneciente a la misma familia pero con movimiento comercial; Actualmente los estudios sobre piperáceas como *Piper marginatum* (Anisillo), *Piper auritum* (Santamaría), *Piper lenticellosum* (Cordoncillo oloroso) entre otras, apenas se desarrollan, *Piper nigrum* conocida como pimienta negra es la piperácea de mayor

comercialización a nivel mundial,^[23] sin embargo su uso es muy diferente al que podría tener el aceite de *Piper Aduncum* aquí tratado.

6. BALANCES DE MATERIA

- Arrastre con vapor de agua:

Calderín

Balance de agua:

$$\begin{aligned} \cancel{\text{Entra}} - \text{Sale} + \cancel{\text{Genera}} &= \text{Acumula} \\ -F &= \frac{dm}{dt} \end{aligned}$$

$$F = -\rho * A * \frac{dh}{dt}$$

$$F * \int_0^{135} dt = \frac{-1\text{g}}{\text{cm}^3} * 180\text{cm}^2 * \int_{28,2942}^{19,8059} dh$$

$$F = 11,3177 \text{ g/min}$$

Donde:

dm/dt: Variación de la masa de agua dentro del calderín con respecto al tiempo.

ρ : Densidad del agua = 1g/cm³

A: Area del generador = 180 cm²

dh/dt: Variación de la altura del agua dentro del calderín con respecto al tiempo.

F: Flujo de vapor que sale del calderín.

Cámara extractora

Balance de agua:

Entra – Sale + Genera = Acumula

$$F - X_1 * F_1 = \frac{dm}{dt}$$

$$11,3177 \frac{g}{\text{min}} - 0,9995 * \left(10,3555 \frac{g}{\text{min}} \right) = \frac{dm}{dt}$$

$$0,9674 \frac{g}{\text{min}} * \int_0^{135} dt = \int_0^{m_{H2O}} dm_{H2O}$$

$$m_{H2O} = 130,5960 \text{ g}$$

Donde:

F: Flujo másico de vapor que entra al extractor = 11,3177 g/min

F₁: Flujo másico de salida de vapor más aceite = 10,3555g/min

X₁ : Composición del agua en la corriente de salida del extractor = 0,9995

T: Tiempo de extracción = 135 minutos.

Balance de aceite:

Entra – Sale + Genera = Acumula

$$-(1 - X) * F_1 = \frac{dM}{dt}$$

$$-(0,0005) * 10,355 \frac{g}{\text{min}} = \frac{dM}{dt}$$

$$0,0052 * \int_0^{135} dt = \int_0^M dM$$

$$-(M - 500) = 0,7020$$

$$M = 500 - 0,7020$$

$$M = 499,2980 \text{ g}$$

Donde:

F_1 : Flujo másico de salida de vapor más aceite.

(1-X): Composición másica del aceite en la corriente de salida del extractor = 0,0005

M: Masa de materia prima más aceite que sale de la cámara extractora en un tiempo de 135 minutos.

dM/dt : Variación de la masa de materia prima más aceite con respecto al tiempo

- **Hidrodestilación:**

Balance de agua:

$$\cancel{\text{Entra}} - \text{Sale} + \cancel{\text{Genera}} = \text{Acumula}$$

$$- X_1 * F_1 = \frac{dm_{H_2O}}{dt}$$

$$-(0.9981) * (15.1852) = \frac{dm_{H_2O}}{dt}$$

$$(m_f - m_0) = -2046,1070$$

$$m_f - 4000 = -2046,1070$$

$$m_f = 1953,893 \text{ g}$$

Balance de aceite:

$$\cancel{\text{Entra}} - \text{Sale} + \cancel{\text{Genera}} = \text{Acumula}$$

$$-(1 - X)F_1 = \frac{dm}{dt}$$

$$-(0.019) * 15,1852 = \frac{dm}{dt}$$

$$0,028852 * \int_0^{135} dt = - \int_{500}^M dm$$

$$3,8950 = - (M - 500)$$

$$M = 496,1050$$

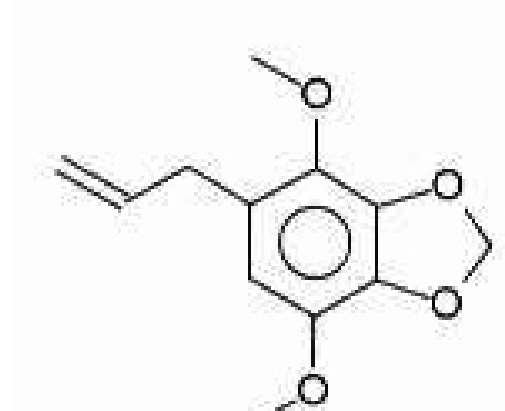
$$m_{\text{aceite}} = 3,8950$$

7. USOS DEL ACEITE ESENCIAL OBTENIDO

Entre los constituyentes predominantes del aceite extraído fueron encontrados: Apiol, germacreno-D, miristicina, piperitona, cariofileno, copaeno, fenaldreno, beta-pineno, linalol

Apiol: $C_{12}H_{14}O_4$

Figura 18. Fórmula estructural del Apiol.



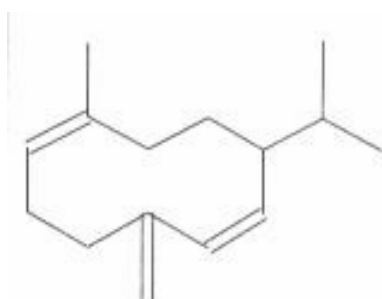
1,2-metilendioxi-3,6-dimetoxi-4-alilbenzeno

- Aislamiento: Por enfriamiento del aceite a bajas temperaturas y posterior recristalización con alcohol y éter de petróleo.^[22]
- Caracterización: En oxidación con permanganato de potasio produce apiol aldehído y ácido apiólico cada uno con punto de fisión de 102°C y 173°C respectivamente; Tratado en exceso con bromo en bisulfito de carbono produce bromo apiol dibromuro $(CH_3O)_2C_6Br(O_2CH_2)*C_3H_5Br_2$ que funde entre 80 y 85 °C.^[22]

- Propiedades: El apiol se cristaliza en forma de largas puntas incoloras, su olor es débil y semejante al del perejil, es casi insoluble en agua, soluble en éter, alcohol y aceites grasos. Punto de fusión: 28°C, punto de ebullición: 292°C, N_D^{14} :1.5380. [22]

Germacreno D: $C_{15}H_{24}$

Figura 19. Fórmula estructural del Germacreno D

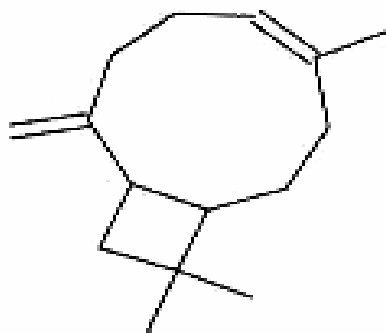


Sesquiterpeno que se encuentra en plantas como el girasol rojo, *erva cidreira*, azahar del campo y centella asiática.

Se utiliza como plaguicida y constituye una importante feromona que estimula la comunicación entre insectos. [22]

Cariofileno: $C_{15}H_{24}$

Figura 20. Fórmula estructural del Cariofileno.

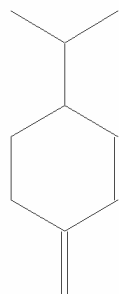


Peso específico (20°C): 0.903, N_D^{20} :1.5, intervalo de ebullición: 258°C – 261°C.

presenta actividad como agente antiasmático, antibacterial, antiinflamatoria, antiespasmódico, es utilizado como sedante y tiene propiedades funguicidas, pesticidas e insecticidas. Es usado en odontología, repostería, perfumería y en jabones.^[25]

Fenaldreno: $C_{10}H_{16}$

Figura 21. Fórmula estructural del Fenaldreno.

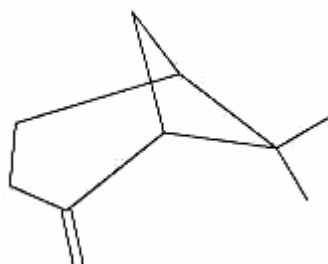


Terpeno monocíclico que se encuentra en forma de isómeros d y l.

Propiedades: Aceite móvil de olor agradable, insoluble en agua y alcohol, soluble en éter, de toxicidad no conocida. Peso específico (20°C):0.832, N_D :1,48,intervalo de ebullición: 171°C-172°C. Es utilizado como aromatizante y en perfumería.^[25]

Beta Pineno: $C_{10}H_{16}$

Figura 22. Fórmula estructural del Beta Pineno.

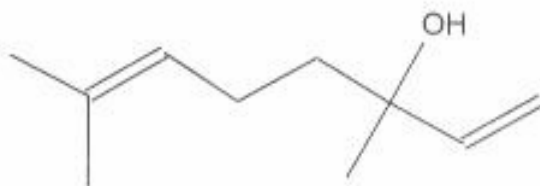


Hidrocarburo terpénico obtenido de la trementina de la madera, es levógiro y se encuentra junto al alfa pineno en los aceites de madera y pino y en otros aceites etéreos. Es un líquido transparente, de olor característico, peso específico (15.5/15.5 °C): 0.8740-0.8770, N_D^{20} : 1.4775-1.4790, rotación óptica: -22° , intervalo de ebullición: $164^\circ\text{C} - 169^\circ\text{C}$.

Antinflamatorio, antiséptico, antiespasmódico, herbicida, insecticida, pesticida. Es utilizado en resinas poliméricas, en la industria de perfumes y aromatizantes.^[22]

Linalol: $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$

Figura 23. Fórmula estructural del linalol.



Se deriva de muchos aceites esenciales, particularmente de los de palo de rosa, madera de linaloe, aceite de bergamota y otros. Se obtienen sintéticamente a partir del geraniol.

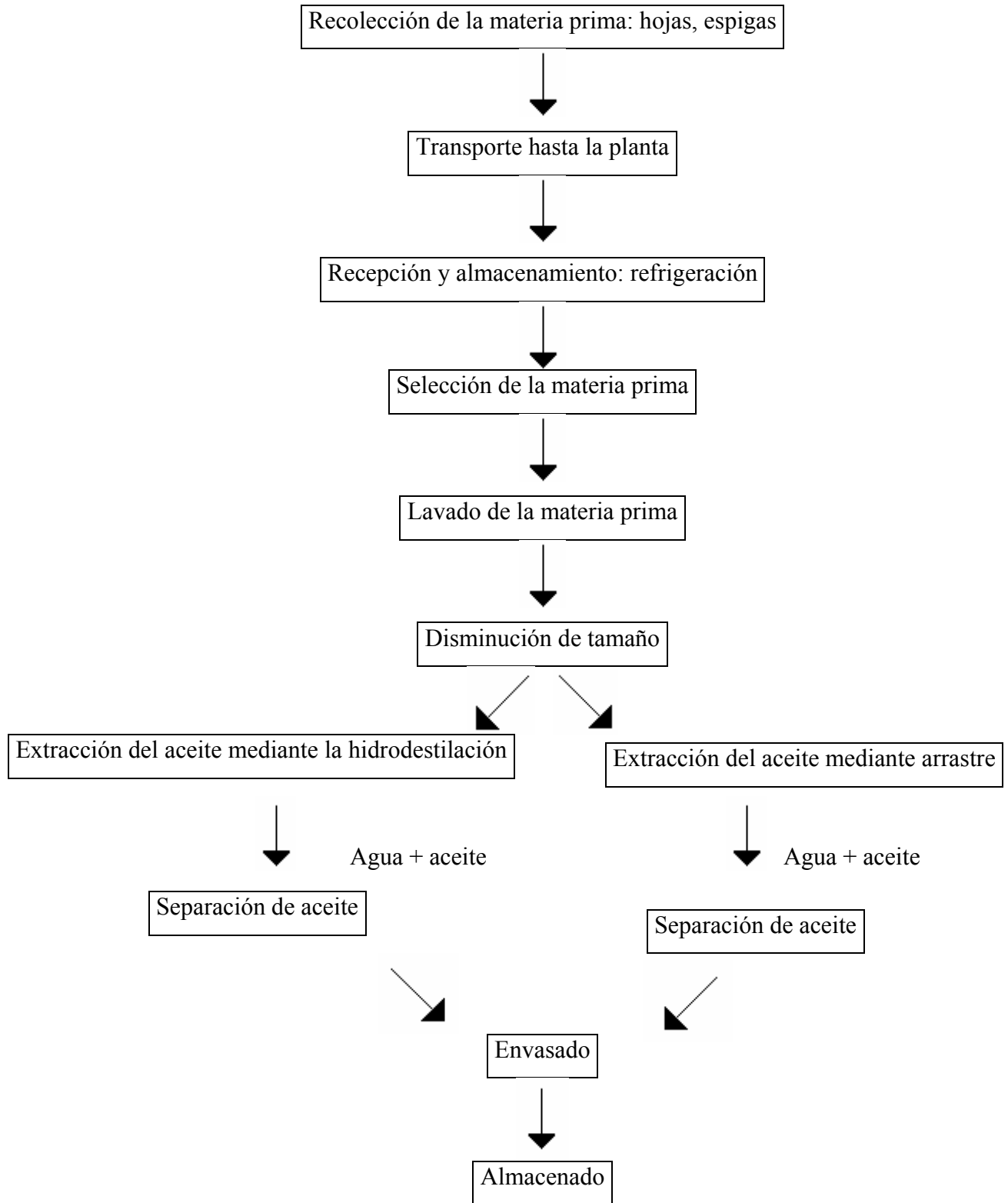
Líquido incoloro, olor parecido al del aceite de bergamota, soluble en alcohol y eter, intervalo de ebullición: $195^\circ\text{C} - 199^\circ\text{C}$. Se utiliza en perfumerías y como aromatizante.^[25]

La existencia de una sustancia en particular puede dar origen al uso que pueda tener el aceite obtenido; La combinación de los elementos apiol, miristicina y piperitona en las cantidades obtenidas de 57.7%, 24.609% y 5.125% respectivamente indican que puede ser tratado como insecticida o como agente sinergista. La condición de sinergista es atribuida a una sustancia cuando potencia la actividad de otra al ser adicionada (requiriéndose menor cantidad de la segunda). Estos porcentajes corresponden a la extracción realizada a través de hidrodestilación, utilizando espigas.

Cuatro componentes de familias de plantas aromáticas han sido reconocidos como insecticidas: D- carvona, miristicina, apiol y su isómero el dilapiol. D- carvona posee alta actividad biológica cuando se encuentra en altas concentraciones, sin embargo el apiol, dilapiol y la miristicina son mucho más tóxicos para insectos que d- carvona y también actúan como sinergistas de insecticidas sintéticos en dosis menores.^[16]

El apiol tiene 2 grupos metóxilos que aparentemente son más tóxicos que la miristicina con un solo grupo y es mejor sinergista con el insecticida Paration (O-paranitrofenilfosfotioato) que con el carbaryl (N-metil carbamato de 1 naftilo).^[16] Para la piperitona se reporta su actividad como repelente ^{[17],[19]} y funguicida ^[18]. Otros componentes encontrados como el germacreno-d, β - pineno y cariofileno se atribuyen propiedades plaguicidas e insecticidas.

8. DIAGRAMA DE BLOQUES PRELIMINAR DEL PROCESO



9. CONCLUSIONES

- Los rendimientos obtenidos se ven seriamente afectados por la clase de equipo que se utilice y el manejo de variables como la presión y la temperatura; al presurizar el equipo se obtienen rendimientos mucho mayores, sin embargo por lo observado en la práctica no es recomendable un incremento superior a 7,0 psi pues es posible que los compuestos sufran algún tipo de descomposición.
- Los rendimientos más altos obtenidos durante la práctica se presentaron en el método de hidrodestilación y utilizando como materia prima espigas (2,1493%), sin embargo este aceite presentó características de apariencia desfavorables. Es mediante este método que se obtienen las cantidades mas altas de los compuestos aprovechables para el uso del aceite como insecticida (apiol, miristicina y piperitona)
- El tiempo no influye de manera notable sobre los rendimientos, para las 2 fracciones de cada ensayo se presentaron porcentajes similares (ver tabla 5). La incidencia del tiempo puede notarse en los compuestos que enriquecen las diferentes fracciones de destilación del aceite sin embargo, cuando se trabaja a presiones diferentes a la atmosférica se disminuye el tiempo que tarda en ebullición un compuesto lo que hizo que compuestos con alto punto de ebullición (como el apiol y el cariofileno) se presentaran en las primeras fracciones recogidas durante la destilación.
- El aceite esencial de *Piper aduncum* procedente de la zona cafetera presentó diferencias considerables con respecto al aceite esencial de plantas de otras regiones, desde el punto de vista de la composición química. Se identificó el apiol como compuesto predominante en el aceite con porcentajes entre 54,4 y 70,664%, siendo las primeras fracciones del destilado enriquecidas con este compuesto en

ambos métodos. Germacreno-d, cariofileno, piperitona y miristicina son otros compuestos que aparecen en abundancia con porcentajes de 17.3, 9.468, 24.609, 5.125 % respectivamente . Se encontraron además fenaldreno, β cubebeno, γ elemeno, copaeno y linalol en proporciones pequeñas pero considerables dentro de las muestras analizadas.

10. RECOMENDACIONES

- Dado el impacto medioambiental que tienen hoy día los productos químicos y dentro de ellos los insecticidas es importante reconocer el uso que puedan tener como tal algunos productos naturales.
- Aprovechar la biodiversidad existente, centrando la atención en la investigación de especies nativas promisorias, desarrollando nuevos productos a partir de ellas.
- Reconociendo la actualidad de las investigaciones realizadas en aceites esenciales deben implementarse equipos que permitan el desarrollo de nuevos estudios y que a la vez impliquen la interacción de la ingeniería química con áreas afines
- Es importante adquirir conocimientos en áreas afines a la ingeniería química, tales como la instrumentación, ya que estas son técnicas de mucha utilidad aplicables a estudios ingenieriles.

BIBLIOGRAFÍA

[1] www.geocities.com

[2] www.bilbo.edu.uy

[3] STASHENKO, Elena. Plantas aromáticas y aceites esenciales. Bucaramanga (Colombia). Universidad Industrial de Santander. Grupo de fitoquímica, escuela de química. 1995.

[4] RAMÍREZ, J. E. LARGO, Luz Adriana. Estudio y extracción de un aceite esencial a partir de la manzanilla. Trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia. 1995.

[5] BANDONI, Arnoldo. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Argentina. Editorial Universidad Nacional de la Plata. 2000

[6] CICCÍO, José F; Constituyentes del aceite esencial de las hojas de piper terrabanum. Centro de Investigaciones en Productos Naturales. Escuela de Química. Universidad de Costa Rica. San José (Costa Rica).

[7] DIAZ, P.P; MALDONADO, E; OSPINA, E. Aceite esencial de piper aduncum. En: Revista Latinoamericana de Química. Vol 15. No 3. 1984. pág 136-138.

[8] GOMEZ ARISTIZABAL, Alvaro. Descripción de malezas en plantaciones de café. Centro nacional de investigaciones del café CENICAFE. Chinchina, Caldas. 1987.

[9] CICCÍÓ, José F; BALLESTERO Cynthia M. Constituyentes volátiles de las hojas y espigas de piper aduncum (piperaceae) de Costa Rica. En: International Journal of Tropical Biology and Conservation. Vol 15. No 2. Junio 1997. pag 783-790.

[10] GUPTA, M.P. 270 plantas medicinales iberoamericanas. Convenio Andrés Bello-CYTED-SECAB. Santafé de Bogotá. Colombia. 1995.

[11] MAIA, J.G.S., M.G.B. Zohhbi, E.H.A. Andrade, A.S. Santos, M.H.L. da Silva, A.I.R. Luz, C.N. Bastos, and M.H.L. da Silva. 1998. Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. Growing wild in the Amazon region. Flavour and Fragrance Journal Vol 13. N°4. Pág 269-272.

[12] <http://www.fs.fed.us/global/iitf/pdf/Piper%20aduncum.pdf>

[13] BERNARD, C.B; CHAURET, D y otros. Insecticidal defenses of piperaceae from the neotropics. En: Journal of Chemical Ecology. Vol 21. No 6. 1995. pag 801-811.

[14] www.plantasmedicinales.org

[15] SAXENA-DB; Tomar-SS; Singh-RP. Fungitoxicity of chemical components and some derivatives from *Anethum sowa* and *Acorus calamus*. Indian perfumer. Vol 34 N° 3. 1990 pág 199-203

[16] LICHTENSTEIN, E. Paul y otros. Insecticidal and synergistic components isolated from dill plants. Journal of agriculture and food chemistry. Vol 22. N° 4. 1974. pág 68-664

- [17] BOWERS-WS; Ortego-F; You-XQ; Evans-PH. Insect repellents from the Chinese prickly ash *Zanthoxylum bungeanum*. *Journal of natural products*. Vol 56. N° 6. 1993 pág: 935-938
- [18] SINGH-SP; Rao-GP; Upadhyaya-PP. Fungitoxicity of essential oils of some aromatic plants against sugarcane pathogens. *Sugar-Cane*. 1998, No. 2, 14-17;
- [19] Wimalaratne-PDC; Slessor-KN; Borden-JH; Chong-LJ; Abate-T. Isolation and identification of house fly, *Musca domestica* L., repellents from pepper tree, *Schinus molle* L. *Journal of chemical ecology*. Vol 22. N° 1. 1996. pág: 49-59
- [20] PINO Benitez, Nayibe. Compuestos químicos mayoritarios en esencia de *Piper auritum* H.B.K. *Revista Institucional Universidad tecnológica del Chocó*. No 16. Pág 13-17. 2002.
- [21] GUENTHER, Ernest. *The essential Oils*. Volumen 1. Editorial New York. 1942.
- [22] GUENTHER, Ernest. *The essential Oils*. Volumen 3. Editorial New York. 1942.
- [23] GUENTHER, Ernest. *The essential Oils*. Volumen 5. Editorial New York. 1942.
- [24] WC, Evans. *Farmacología*. 13° edición. Editorial Mc Graw Hill. 1991.
- [25] GESSNER G, Hawley. *Diccionario de química y de productos químicos*. Segunda edición. Ediciones Omega S.A. Barcelona 1985.
- [26] CALLEJAS, Paulo. *Obtención de extractos etanólicos de plantas en medios acuosos*. Trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia. 2001.

ANEXO A. CONDICIONES DE OPERACIÓN DE LA EXTRACCIÓN MEDIANTE ARRASTRE CON VAPOR DE AGUA

Para todos los ensayos en este método la cantidad de materia prima fue de 500 gramos, y el agua en el calderín de 20 litros.

Solo se reportan los datos para un ensayo, ya que no presentan mucha variación entre un ensayo y la réplica.

Fracción 1: 60 minutos (fracción de cabeza)

Fracción 2: 135 minutos (fracción de cola)

- Hojas

Tabla 21. Condiciones de operación, arrastre con vapor, hojas.

Fracción	Pcalderín (psi)	Pcámara (psi)	Tcalderín (°C)	Vol. Destilado (ml)	T ^H ₂ O (sal) (°C)	T ^H ₂ O (ent) (°C)	Q ^{H2O} (sal) (ml/s)	Tdest
1	7	6,5	98	668	26,5	19,8	12,5	23,7
2	6,5	6	98	730	27,2	20,1	25	23,4

- Espigas

Tabla 22. Condiciones de operación, arrastre, espigas.

Fracción	Pcalderín (psi)	Pcámara (psi)	Tcalderín (°C)	Vol. Destilado (ml)	T ^H ₂ O (sal) (°C)	T ^H ₂ O (ent) (°C)	Q ^{H2O} (sal) (ml/s)	Tdest
1	5	5	98	1375	27,2	19,8	41,6667	23,4
2	5	5	98	1500	28,4	19,8	27,7778	23,3

ANEXO B. CONDICIONES DE OPERACIÓN DE LA EXTRACCIÓN MEDIANTE HIDRODESTILACIÓN

Para todos los ensayos en este método la cantidad de materia prima fue de 500 gramos, y el agua en el calderín de 20 litros.

Solo se reportan los datos para un ensayo, ya que no presentan mucha variación entre un ensayo y la réplica.

Fracción 1: 60 minutos (fracción de cabeza)

Fracción 2: 135 minutos (fracción de cola)

- Hojas

Tabla 23. Condiciones de operación, hidrodestilación, hojas.

Fracción	P cámara (psi)	T destilado (°C)	T H ₂ O entrada (°C)	T H ₂ O salida (°C)	Vol destilado (ml)	Q H ₂ O (l/s)
1	7	22,7	19,4	30,2	1190	0,0156
2	7,5	21,7	20,2	26,7	860	0,0227

- Espigas

Tabla 24. Condiciones de operación, hidrodestilación, espigas.

Fracción	P cámara (psi)	T destilado (°C)	T H ₂ O entrada (°C)	T H ₂ O salida (°C)	Vol destilado (ml)	Q H ₂ O (l/s)
1	6,5	21,5	19,8	22,4	850	0,0500
2	6,5	22,2	19,8	23,8	730	0,0357

ANEXO C. NUMERACIÓN DE LOS ENSAYOS REALIZADOS

NUMERO DE ENSAYO	NUMERO DE MUESTRA	MÉTODO	PARTE DE LA PLANTA	TIEMPO DE EXTRACCIÓN
		1. Arrastre 2. Hidrodesilación	1. Hojas 2. Espigas	1. 60 min 2. 135 min
1	1	1	1	1
	2	1	1	2
2	3	1	2	1
	4	1	2	2
3	5	2	1	1
	6	2	1	2
4	7	2	2	1
	8	2	2	2

Estos ensayos fueron realizados por duplicado.

ANEXO D. FOTOGRAFÍAS DEL MATERIAL Y LOS EQUIPOS UTILIZADOS

a. Hojas y espigas de *Piper aduncum*.



b. Equipos utilizados para la extracción por arrastre con vapor de agua.



c. Equipos utilizados para la extracción por hidrodestilación.



ANEXO E. MÉTODOS UTILIZADOS EN LA CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL EXTRAÍDO

Las propiedades fisicoquímicas evaluadas fueron: densidad, índice de refracción, rotación óptica, punto de ebullición y solubilidad en etanol:

Índice de refracción: el índice de refracción de un compuesto (aceite esencial) con respecto al del aire, corresponde a la razón del seno del ángulo de incidencia al seno del ángulo de refracción emitido, de un rayo de luz que pasa del aire al aceite. Para su medición se requiere de un refractómetro común. Es importante realizar las medidas a la misma temperatura, para lo cual se hace circular a través del prisma, una corriente de agua a 20°C, además se debe limpiar cuidadosamente el prisma con una mezcla etanol-éter.^[26]

La prueba fue realizada utilizando un refractómetro Fisher Scientific. Se agregan unas cuantas gotas del aceite esencial sobre el cristal del refractómetro y se ajusta la mirilla derecha, de manera que las dos porciones se dividan por una línea de color. Posteriormente se hace la lectura por medio de la mirilla izquierda^[26].

Densidad: el procedimiento general para determinar la densidad de una sustancia incluye el manejo de un picnómetro. Debido a las cantidades tan bajas obtenidas en las extracciones, esta propiedad fue evaluada mediante el peso y el volumen ocupado por el aceite en la jeringa utilizada para su extracción. Se empleó una balanza analítica marca Perkin Elmer.

Solubilidad en alcohol: todos los aceites esenciales son solubles en alcohol etílico absoluto y muchos son solubles en alcohol etílico diluido. Así, es posible determinar el

número de volúmenes de alcohol diluido para completar la solubilidad de un volumen de aceite. Por lo general, los aceites más oxigenados son más fácilmente disueltos en alcohol, que los ricos en terpenos^[5].

Para determinar la solubilidad en alcohol, se utilizó alcohol etílico al 95 % de acuerdo con el siguiente procedimiento^[26]:

1. Introducir exactamente 1 cc de aceite esencial dentro de una probeta con tapa de 10 cc calibrada a 0.1 cc, y adicionar lentamente pequeñas porciones de alcohol de concentración conocida. Las concentraciones más empleadas son: 50, 60, 70, 80, 90, 95 porcentaje en volumen.

2. Verificar que la solución se encuentre a 20°C.

3. Agitar la probeta después de cada adición.

4. Cuando la solución se acabe (se disuelva), apuntar la concentración y el número de volúmenes que se usaron. Para describir la apariencia de la mezcla se define la siguiente escala :

- Claramente soluble (CS)
- Ligeramente nebuloso (LN)
- Nebuloso (N)
- Ligeramente opaco (LO)
- Opaco (O)
- Ligeramente turbio (LT)
- Turbio (T)
- Oscuro (Oc)

5. Continuar la adición hasta completar los 10 cc. Si la solución se torna opaca o turbia apuntar los volúmenes a los cuales ocurrió el evento.

6. Reportar el dato como:

Característica de apariencia en volúmenes de alcohol de concentración del alcohol y al completar volúmenes de alcohol se torna características de apariencia. Por ejemplo:

CS-2.7-60%-8-LO significa completamente soluble en 2.7 cc de alcohol al 60% y al completar 8 cc se torna ligeramente opaco.

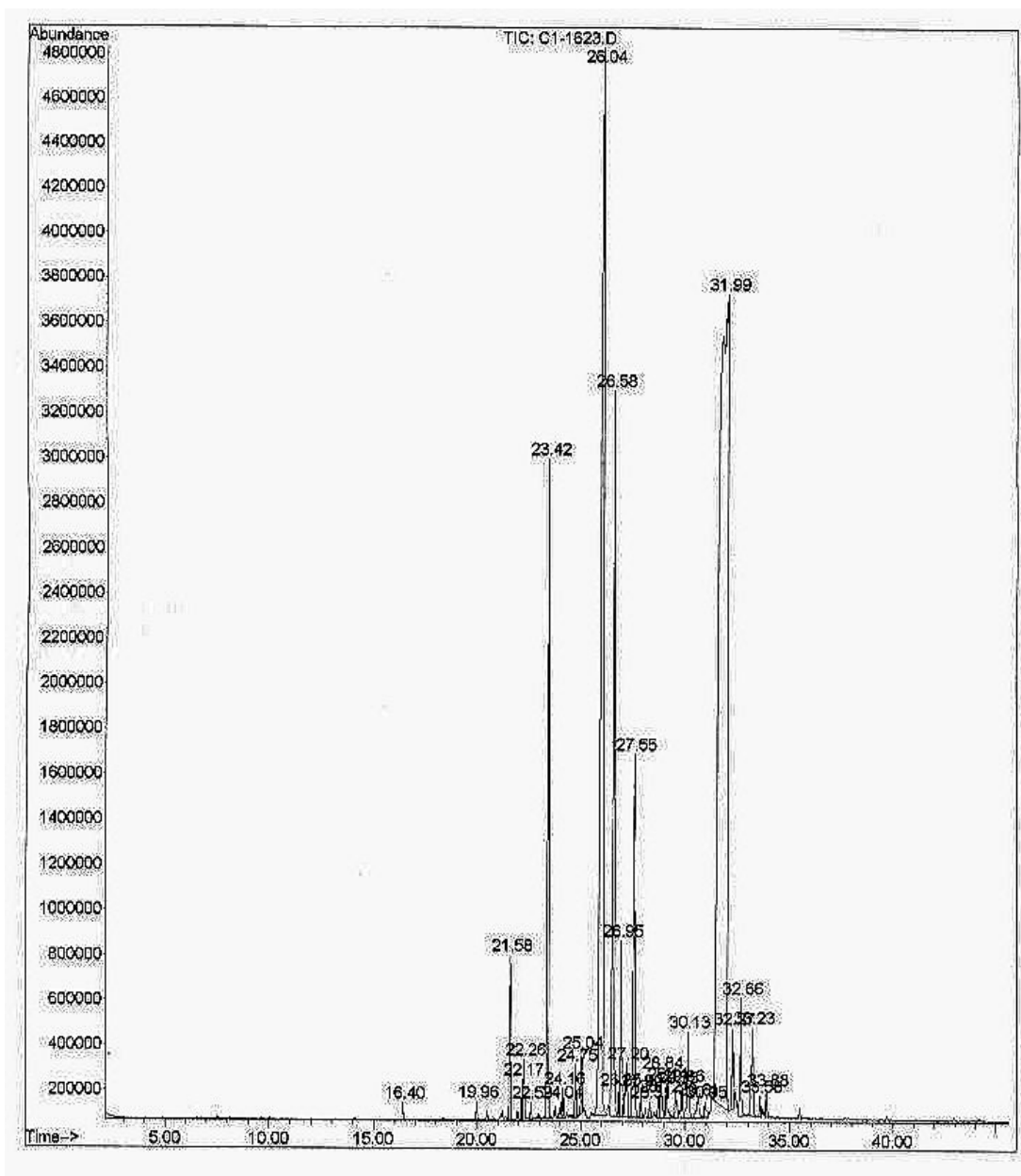
Si no se logra la disolución intentar de nuevo con una concentración de alcohol mayor.

La solubilidad del aceite obtenido en cloroformo, éter de petróleo y éter etílico se determinó por adición y posterior agitación del aceite con estos solventes.

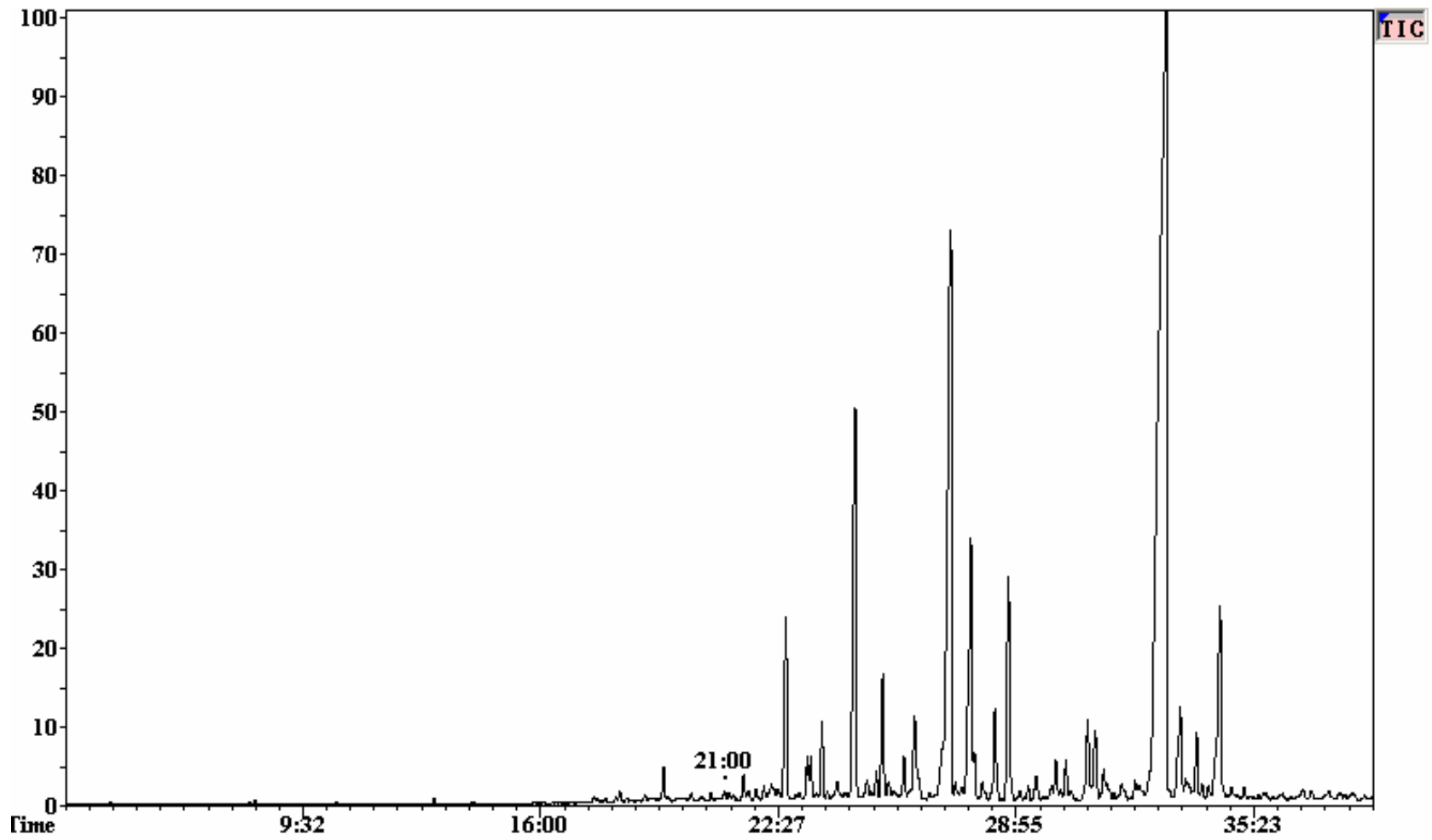
Estas pruebas fueron realizadas en los laboratorios de la Universidad Nacional sede Manizales.

ANEXO F. ESPECTROS CROMATOGRÁFICOS GC/MS DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS DEL ACEITE ESENCIAL DE PIPER ADUNCUM

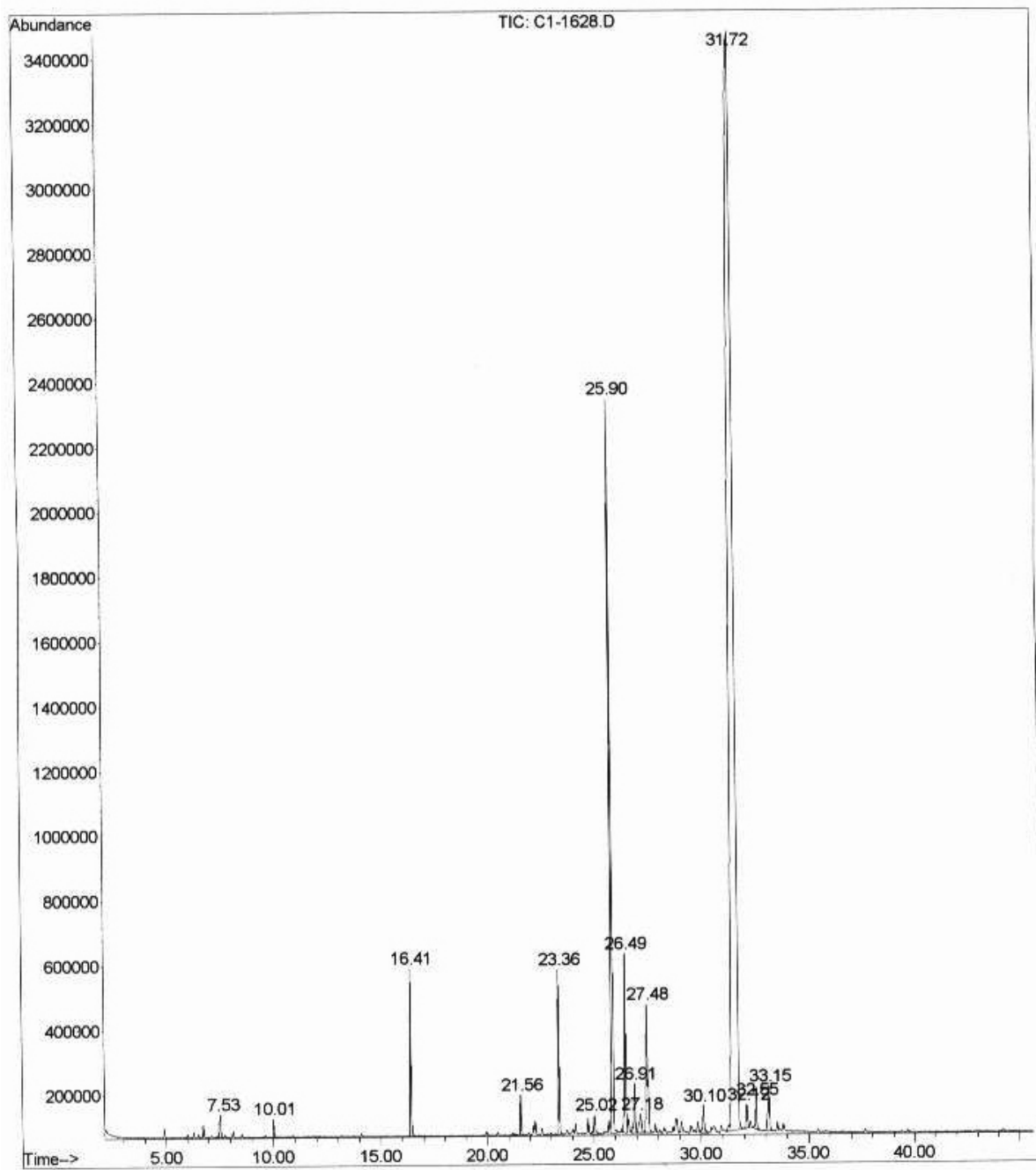
- Muestra 1: Arrastre con vapor de agua, hojas, destilado total.



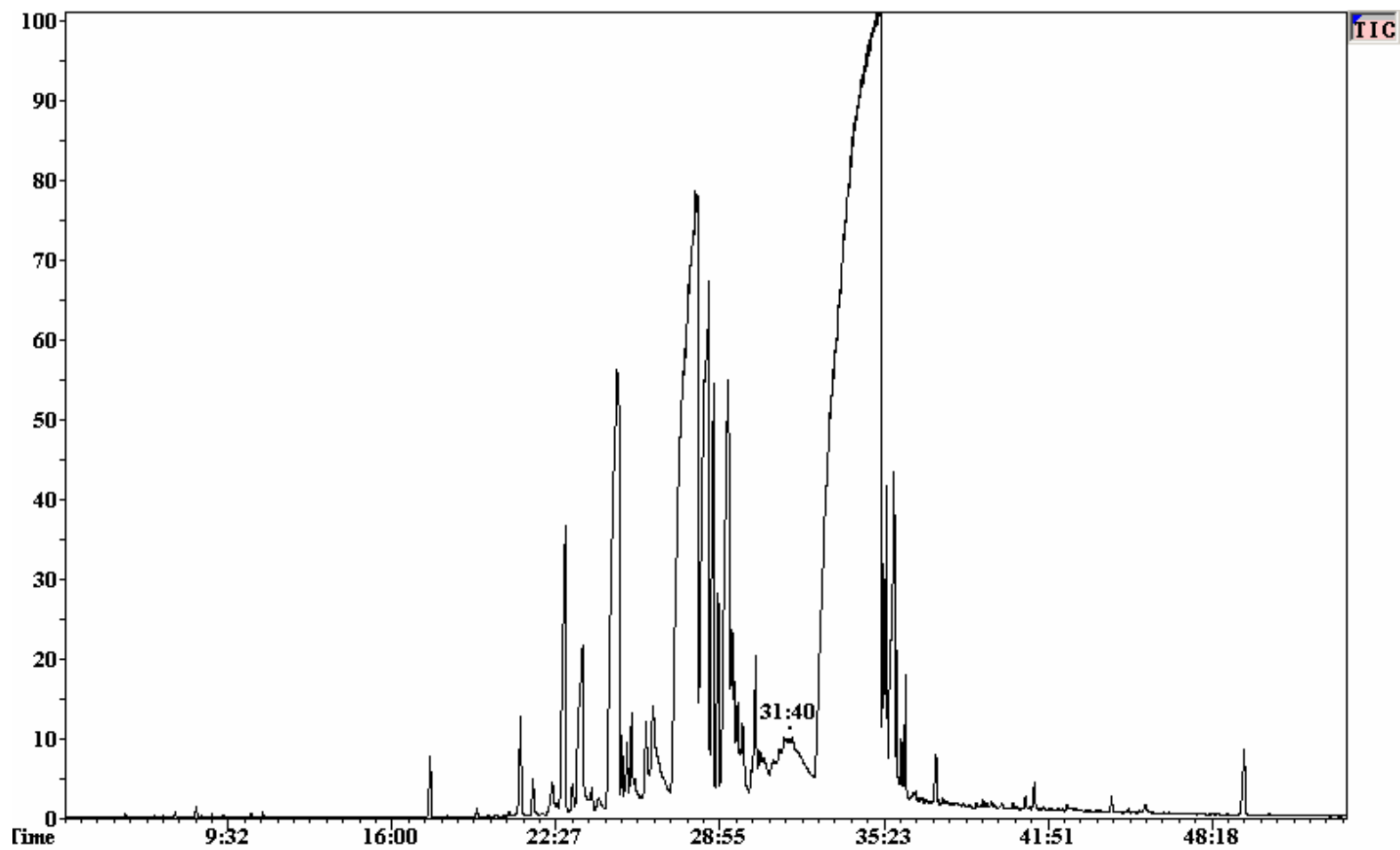
- Muestra 2: Arrastre con vapor de agua, hojas, 135 minutos.



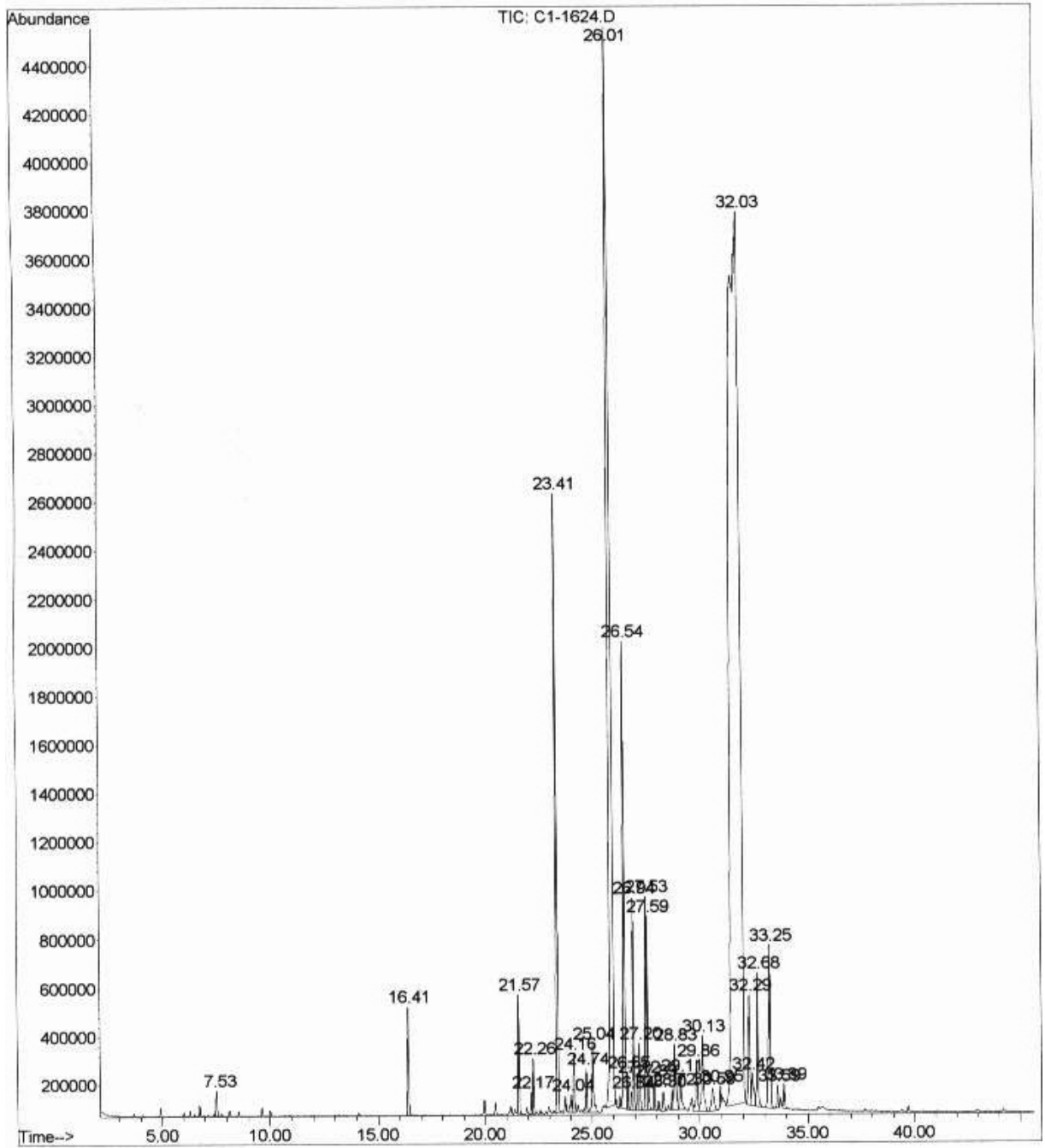
Muestra 3: Arrastre con vapor de agua, espigas, 60 minutos.



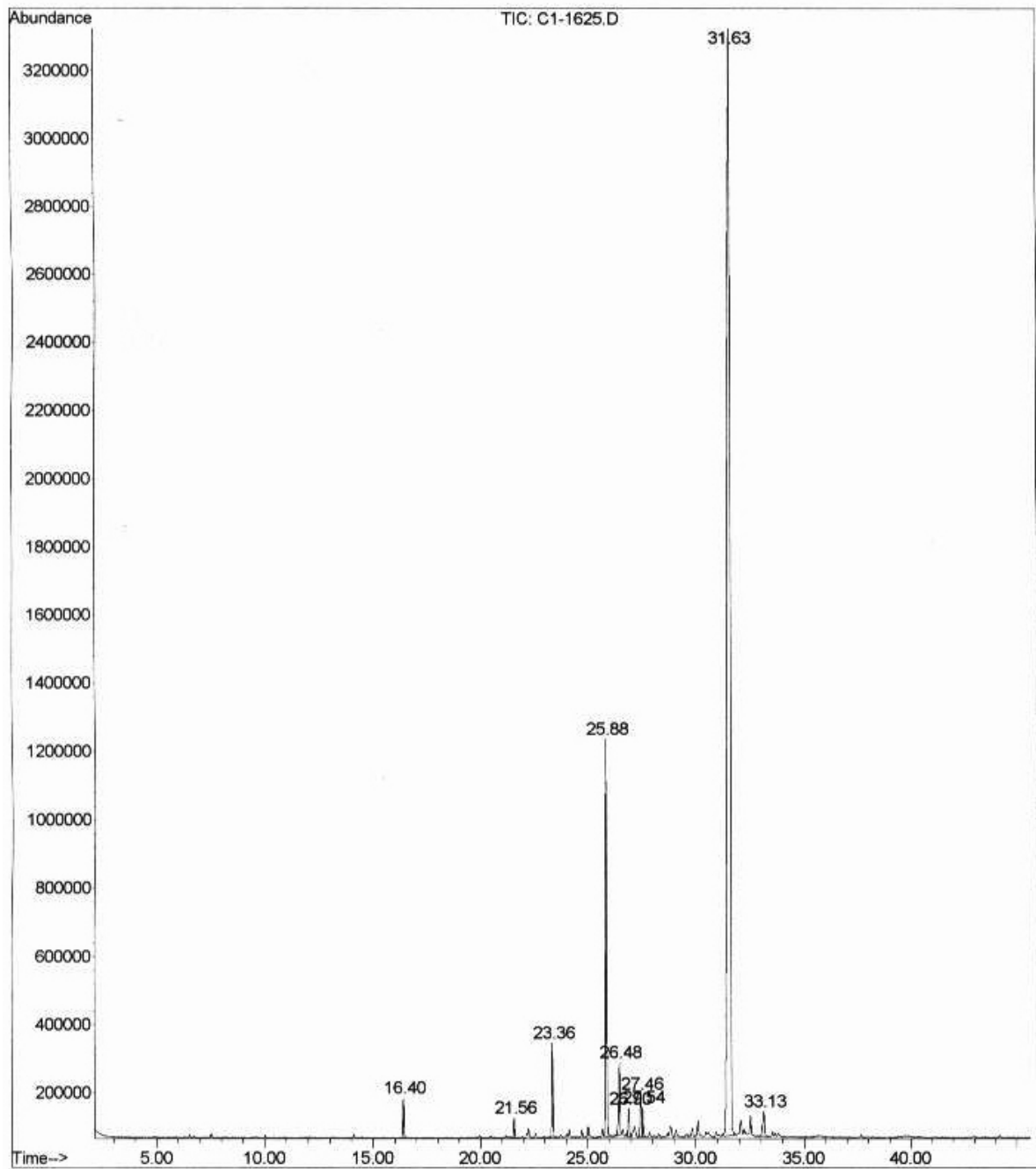
- Muestra 4: Arrastre con vapor de agua, espigas, 135 minutos



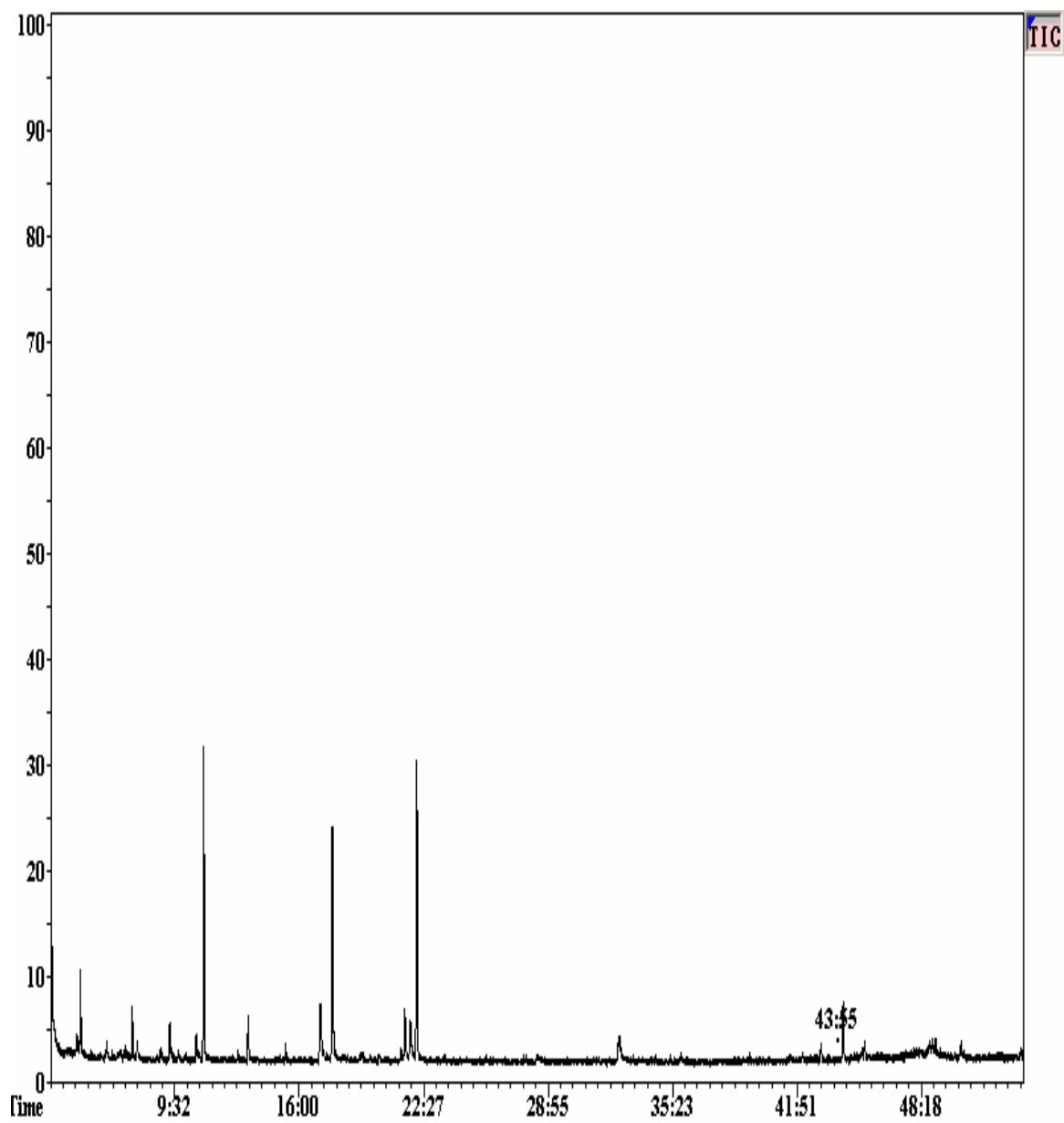
- Muestra 5: Hidrodestilación, hojas, 60 minutos.



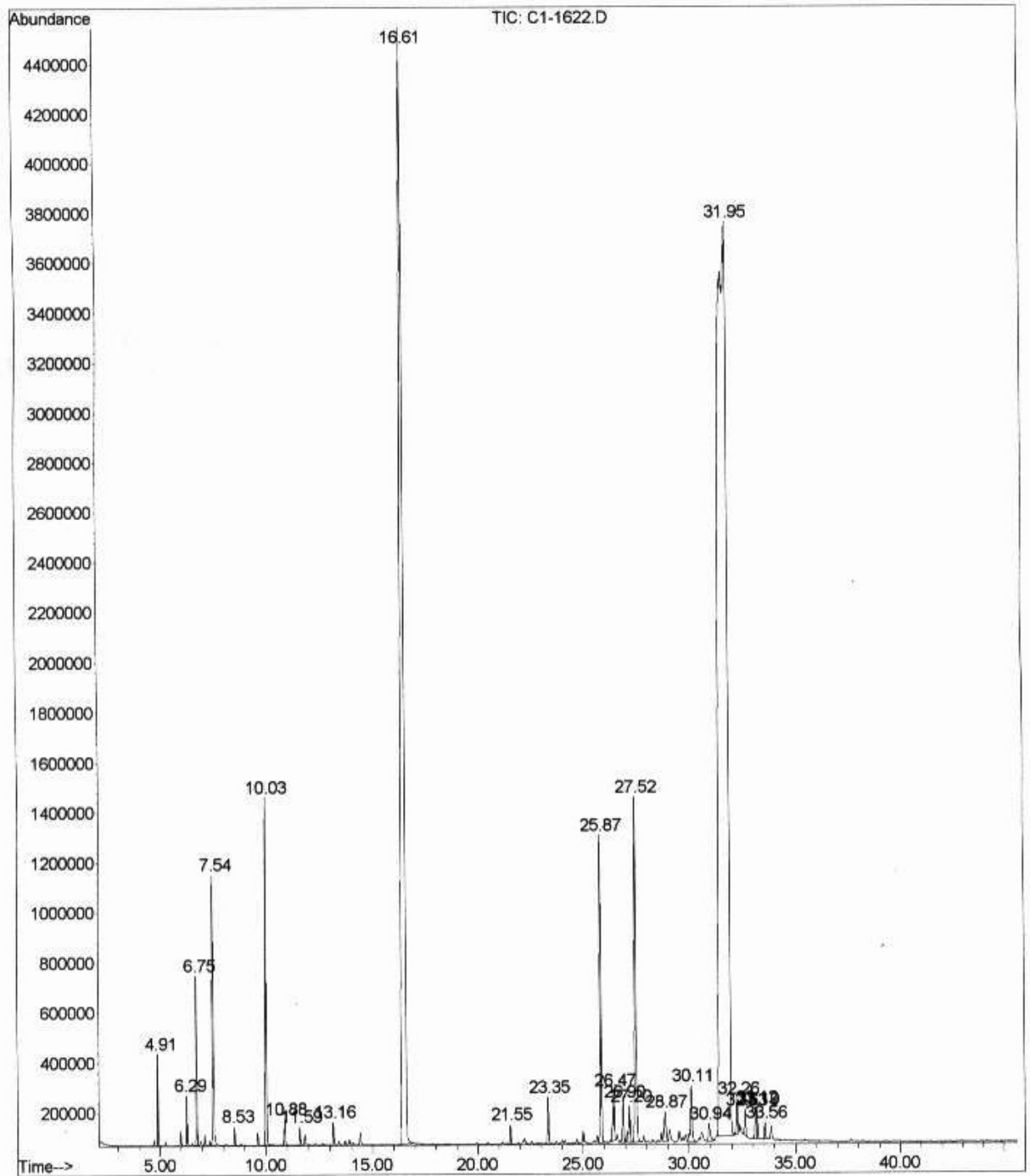
- Muestra 6: Hidrodestilación, hojas, 60 minutos.



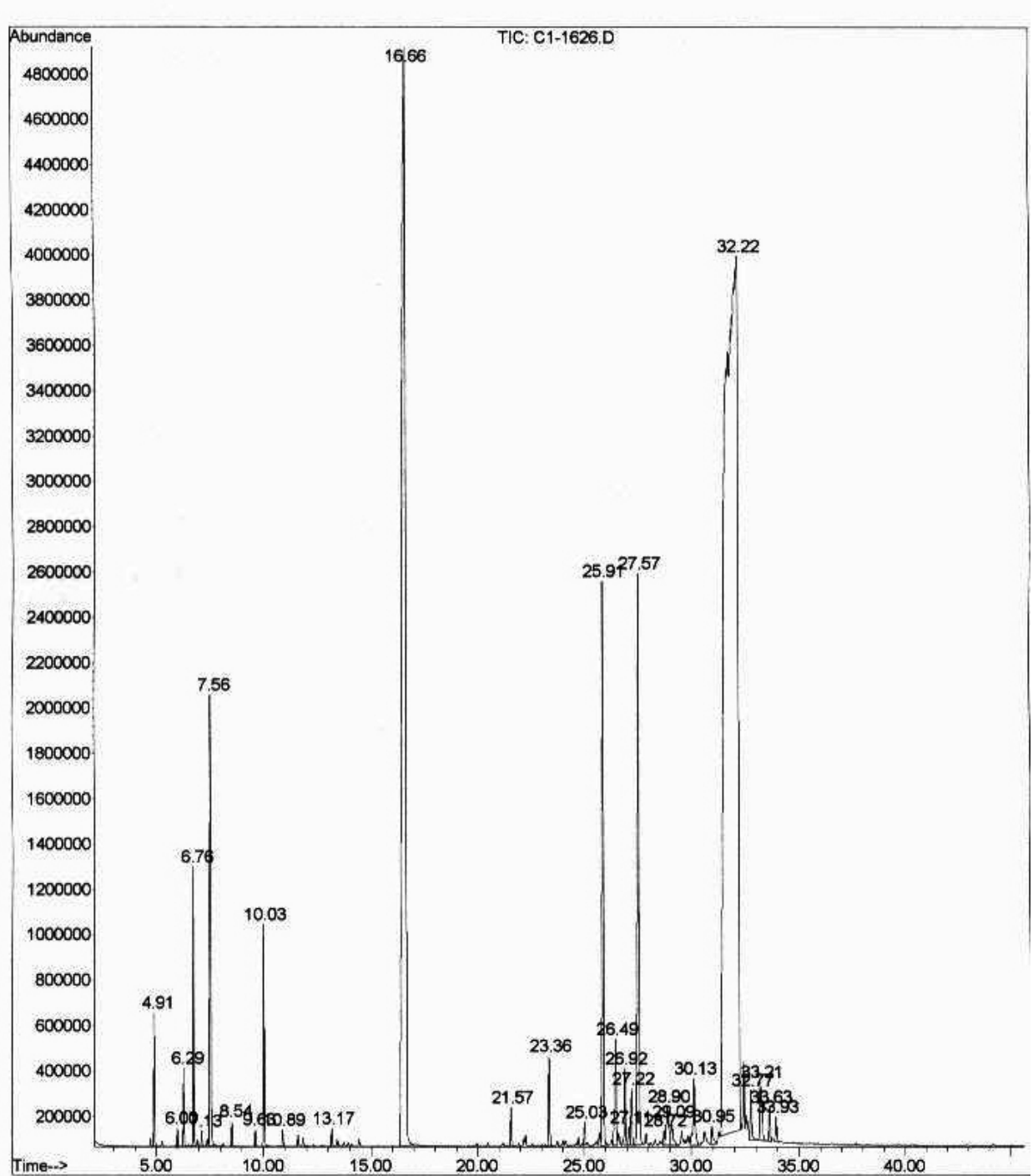
- Muestra 7 : Hidrodestilación, hojas, 135 minutos.



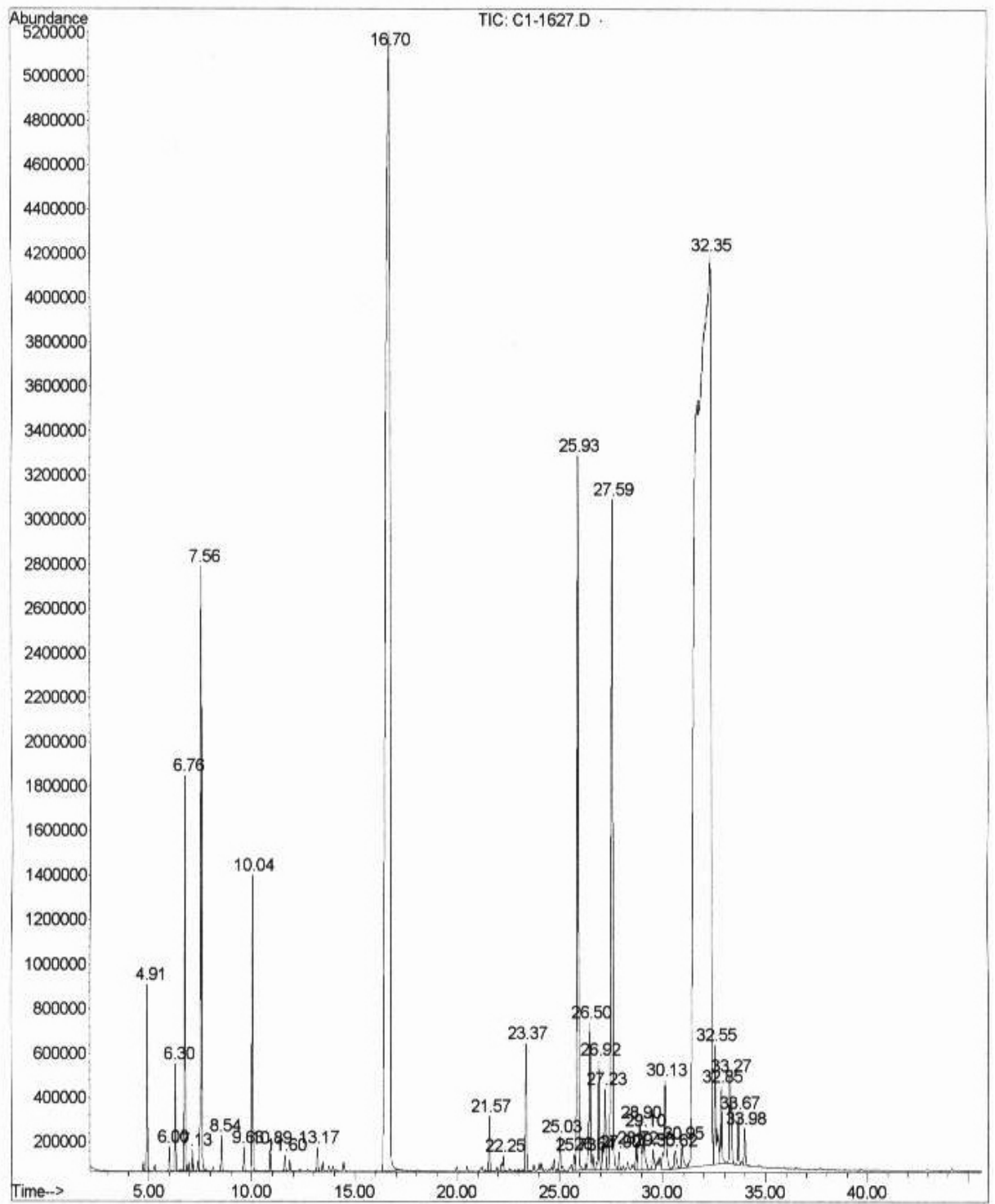
- Muestra 8: Hidrodestilación, espigas, 60 minutos.



- Muestra 9: Hidrodestilación, espigas, 60 minutos.



- Muestra 10: Hidrodestilación, espigas, 60 minutos.



- Muestra 11: Hidrodestilación, espigas, 135 minutos.

