

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y
BIOTECNOLÓGICAS

PROGRAMA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



“EVALUACION DEL CONTENIDO DE I-MENTOL, I-MENTONA Y I-ACETATO
DE MENTILO EN EL ACEITE ESENCIAL DE *Mentha piperita L.*”

TESIS PRESENTADA POR EL BACHILLER EN FARMACIA Y BIOQUIMICA:

SANTOS BENAVIDES JOSE MIGUEL

PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE:

QUIMICO FARMACEUTICO

ASESOR:

PhD. JAIME CARDENAS GARCIA

AREQUIPA - PERÚ

2013

ÍNDICE

I. CAPÍTULO I: GENERALIDADES

INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	3
HIPÓTESIS	4

II. CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1.ACEITES ESENCIALES	5
2.1.1. Breve Reseña Histórica.....	5
2.1.2. Definición	5
2.1.3. Características Físicas de los Aceites Esenciales.....	6
2.1.4. Usos de los Aceites Esenciales.	6
2.1.5. Tipos de Aceites Esenciales.....	8
2.1.6. Factores que Influyen sobre la Composición y Rendimiento de los Aceites Esenciales	8
2.1.7. Composición Química	9
i. No Terpenoides	9
ii. Terpenoides	9
2.1.8. Biogénesis de los Aceites Esenciales.....	12
2.1.9. Obtención de los Aceites Esenciales.....	15
a) Destilación.....	15
b) Expresión de Pericarpio	15
c) Dilución en Grasa (enfleurage)	16
d) Extracción con Disolventes Orgánicos	16
e) Extracción con Gases en Condiciones Supercríticas	16
2.1.10. Método de Destilación de Aceites Esenciales.....	17
a) Destilación por Arrastre a Vapor	17
b) Hidrodestilación	17
c) Hidrodestilación Clevenger.....	17
2.1.11. Rectificación de Aceites Esenciales.....	21

2.1.12. Fraccionamiento	21
2.1.13. Desterpenado de los Aceites Esenciales	21
2.2. <i>Mentha piperita L.</i>	22
2.2.1. Taxonomía	22
2.2.2. Nombres Vulgares	22
2.2.3. Etimología	23
2.2.4. Origen	23
2.2.5. Descripción Botánica	23
2.2.6. Composición Química	23
2.2.7. Aceite Esencial de <i>Mentha piperita L.</i>	23
2.2.8. Propiedades funcionales del AE. De <i>Mentha piperita L.</i>	24
2.2.9. Genotoxicidad y precauciones	24
2.2.10. Constitución Química del AE. De <i>Mentha piperita L.</i>	24
a) Mentol	26
b) Mentona	26
c) Acetato de Mentilo	26
2.3. ANÁLISIS Y CONTROL DE CALIDAD DE LOS ACEITES ESENCIALES	
2.3.1. Drogas Vegetales Aromáticas como Materia Prima	27
2.3.2. Objetivos de Control de Calidad de Drogas Vegetales Aromáticas	27
2.3.3. Normas de Calidad para Aceites Esenciales	28
a) Para Fragancias	28
b) Para Sabores o Alimentación	28
c) Para Industria Farmacéutica y Cosmética	28
d) Para Uso Industrial	29
2.3.4. Análisis de la Composición de los Aceites Esenciales	29
2.3.5. Evaluación de la Concentración de los Aceites Esenciales	30
2.3.6. Análisis Realizados para el Control de Calidad de AE.	30
2.4. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS	
2.4.1. Cromatografía de Capa Fina	32
a) Eluyentes más comunes para cromatografía en capa fina	32
b) Reveladores más comunes para cromatografía en capa fina	33
c) Adsorbentes más comunes para cromatografía en capa fina	33
d) Concepto de Rf.	33
2.4.2. Cromatografía de Gases	33

A.	Antecedentes/Historia	33
B.	Fundamentos Teóricos	35
i.	Teorías de las Placas Teóricas	35
ii.	Teoría Cinética	35
iii.	Teoría de las Columnas Capilares	36
C.	Terminología	37
D.	Funcionamiento de un Cromatógrafo de Gases	38
E.	Características de las Muestras para que puedan ser Analizadas por GC	39
F.	Componentes de un Cromatógrafo de Gases	40
1.	Gas Carrier	40
2.	Sistemas de Inyección	42
3.	Columna	45
4.	Programación de la Temperatura	51
5.	Detectores	52
a)	Detector de Conductividad Térmica (TCD)	53
b)	Detector de Ionización de Flama (FID)	53
c)	Detector Fotométrico de Flama (FPD)	54
d)	Detector de Captura de Electrones (ECD)	55
e)	Detector de Fotoionización (PID)	56
f)	Espectrómetro de Masas	57
6.	Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas	59
a)	Muestras para GC-MS	61
b)	Sistemas de Muestreo GC-MS	61
c)	Cuantificación GC-MS	62
III.	CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS	65
IV.	CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	86
V.	CONCLUSIONES	113
VI.	BIBLIOGRAFÍA	114
VII.	ANEXOS	117

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haber iluminado mi camino en los momentos de frustración y desesperanza.

Al Doctor Jaime Cárdenas García, quien me asesoró en este trabajo de investigación, impartíendome sus conocimientos, consejos y apoyo.

A mis padres.

A mis amigos, en especial a Cynthia y Janeth.



RESUMEN

El presente trabajo de investigación fue realizado en los Laboratorios de Química Orgánica y Control de Calidad de la Universidad Católica de Santa María durante los meses de abril a diciembre del 2012.

Se obtuvo tres muestras de Aceite Esencial por Hidrodestilación con trampa Clevenger a partir de hojas y tallos *Mentha piperita L.* correspondientes a: Muestra A, Muestra B y Muestra C, muestras que se encontraban desecadas previamente por razones de terreno de cultivo, tiempos de siembra y cosecha, obtenidas de lotes distintos pero de un mismo proveedor y lugar de origen. Obteniéndose porcentajes de rendimiento de aceite esencial: 1.18% (Muestra A), 0.61% (Muestra B) y 0.88% (Muestra C).

Obtenidas las muestras de aceite esencial de *Mentha piperita L.* Se procedió a determinar sus principales características fisicoquímicas, llevando a cabo los siguientes ensayos: Características organolépticas (olor característico, sabor picante y color verde traslucido) para las tres muestras A, B y C, Poder Rotatorio (A: -30° , B: -27.5° y C: -27.5°), Densidad (A: 0.8991 g/ml, B: 0.8994 g/ml y C: 0.8987 g/ml), Índice de Refracción (A: 1.4643, B: 1.4573 y C: 1.4622) e Índice de Acidez (A: 1.6715 mg KOH/g de aceite, B: 1.6881 mg KOH/g de aceite, y C: 1.5759 mg KOH/g de aceite,).

Luego se sintetizó y purificó los estándares de l-Mentona, y l-Acetato de Mentilo a partir del Estándar de l-Mentol, obteniendo sus Perfiles Cromatográficos y respectivas estructuras químicas por GC-MS, para comprobar que la síntesis y purificación se llevaron adecuadamente siguiendo el protocolo estipulado. Posteriormente se procedió a realizar un análisis cualitativo de los estándares de l-Mentol, l-Mentona y l-Acetato de Mentilo versus las tres muestras de AE. de *Mentha piperita L.* obtenidos, por CCF, obteniendo similaridad en los Rf, y las manchas respectivas a cada componente químico: Rf 0.48 con mancha azul violeta para Mentol, Rf. 0.64 con mancha amarilla para Mentona y Rf.0.82 con mancha azul violeta para Acetato de Mentilo.

Se procedió a realizar la cuantificación por método de patrón externo de l-Mentol, l-Mentona y l-Acetato de Mentilo en las tres muestras de AE. de *Mentha piperita L.*, utilizando como técnica Cromatografía de Gases acoplada a Espectrómetro de Masas marca Shimadzu modelo QP Plus 2010, columna RTX-5MS (5% fenil / 95% dimetilpolisiloxano) de 30 m de longitud, 0.25 μ m de espesor y 0.25 mm de diámetro, utilizando como gas

carrier Helio y temperaturas programadas de 40 °C el horno y 240°C el inyector en una rampa de 40-110-200 y 240°C , con un flujo de columna de 1.06 ml/mi con soluciones de aceite esencial disuelto en diclorometano grado GC. y un volumen de inyección de 2 ul. Se obtuvo los perfiles cromatográficos, tiempos de retención y áreas bajo la curva correspondientes a cada componente químico.

Finalmente se obtuvieron los siguientes resultados: Muestra A (l-Mentol 10.93%, l-Mentona 22.64% y l-Acetato de Mentilo 43.00%), Muestra B (l-Mentol 10.16%, l-Mentona 15.97% y l-Acetato de Mentilo 62.67%) y Muestra C (l-Mentol 9.07%, l-Mentona 11.19% y l-Acetato de Mentilo 50.03%). Resultados que fueron evaluados considerando los factores que son determinantes en la composición y concentración del Aceite Esencial de *Mentha piperita L.* como son factores edafológicos, climáticos, fecha de recolección, edad de la planta, fertilización, etc.

ABSTRACT

This research was conducted in the Laboratory of Organic Chemistry and Quality Control at the Catholic University of Santa Maria during the months of April to December 2012.

Three samples were obtained by hydrodistillation of essential oil with Clevenger trap from leaves and stems *Mentha piperita* L. for: Sample A, Sample B and Sample C, samples were dried reasons previously cultivated land, planting and harvest times, obtained from the same place of origin. Obtained percentages of essential oil yield: 1.18% (Sample A), 0.61% (Sample B) and 0.88% (Sample C).

Samples obtained essential oil of *Mentha piperita* L. We proceeded to determine their main physicochemical characteristics, carrying out the following tests: organoleptic characteristics (odor characteristic spicy flavor and translucent green) stop the three samples A, B and C, the optical rotation (A: -30° , B: $-$ and 27.5° C: -27.5°) Density (A: 0.8991 g / ml, B: 0.8994 g / ml and C: 0.8987 g / ml), refractive index (A: 1.4643, B: 1.4573, C: 1.4622) and acid number (A: 1.6715 mg KOH / g oil, B: 1.6881 mg KOH / g of oil, and C: 1.5759 mg KOH / g oil).

Then was synthesized and purified standards of l-menthone, l-menthyl acetate from l-Menthol Standard, obtaining their respective chromatographic profiles and chemical structures by GC-MS to check that the synthesis and purification were carried adequately following the protocol provided. Then we proceeded to perform a qualitative analysis of the standards of L-menthol, l-menthone and l-menthyl acetate versus the three samples AE. *Mentha piperita* L. obtained by TLC, obtaining similarity in R_f , and the respective spots each chemical component: R_f 0.48 with Menthol violet blue stain, R_f 0.64 with a yellow stain menthone and R_f 0.82 with violet menthyl acetate.

The procedure to perform the method of quantification by external standard of l-menthol, l-menthone and l-menthyl acetate in the three samples AE. *Mentha piperita* L.,

using technique coupled Gas Chromatography Mass Spectrometer model Shimadzu QP brand Plus 2010, RTX-5MS column (5% phenyl / 95% dimethyl polysiloxane) 30 m long, 0.25 μm thick and 0.25 mm in diameter, using helium as carrier gas and temperature programmed from 40 ° C oven and the injector 240 ° C at a ramp 40-110-200 and 240 ° C, with a column flow of 1.6 ml / mi solutions of essential oil dissolved in dichloromethane GC grade. and an injection volume of 2 μl . Profiles was obtained chromatographic retention times and areas under the curve for each chemical component.

Finally we obtained the following results: Sample A (l-Menthol 10.93%, l-menthone 22.64% and l-menthyl acetate 43.00%), Sample B (l-Menthol 10.16%, l-menthone 15.97% and l-acetate menthyl 62.67%) and Sample C (l-Menthol 9.07%, l-menthone 11.19% and l-menthyl acetate 50.03%). Results were evaluated by considering the factors that determine the composition and concentration of essential oil of *Mentha piperita L.* such as soil factors, climate, harvest date, plant age, fertilizer, etc..

CAPÍTULO I

GENERALIDADES

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha venido incrementando significativamente el interés por los productos naturales, principalmente por las plantas medicinales y hierbas aromáticas, por sus variados usos y aplicaciones, convirtiéndolas en la elección preferida de consumo en el mercado nacional y mayoritariamente a nivel mundial.

Y siendo hoy en día los Aceites Esenciales, que son metabolitos secundarios producidos por las plantas, en uno de los productos con alto crecimiento de exportación peruana desde el año 2002 (más de 12.2 millones de dólares al año) (fuente estadística de EXPORTACIONES PERUANAS VERITRADE LTD). Y entre ellos el aceite esencial de *Mentha piperita L.* con gran importancia comercial por sus diferentes usos como son: preparados para tos como inhaladores nasales, pastas dentífricas, en la industria de los licores, confitería, perfumería, cosmética, industria farmacéutica, etc.

Pero en la actualidad, las industrias nacionales e internacionales están sometidas a las reglas de mercado, que imponen una exigencia de calidad, sin las cuales un determinado producto no sería utilizado por los consumidores.

Por lo que la Evaluación de Calidad de estos aceites esenciales es una tarea de vital importancia en las industrias, y también como criterio de factibilidad de emprender el negocio de producción natural de aceites esenciales, a través de una serie de ensayos de calidad con la finalidad de caracterizar el aceite obtenido, cumplir con las normas de calidad, detectar adulteraciones, discriminar calidades, como base de datos, determinar concentraciones de los compuestos químicos, conocer sus estructuras químicas, etc.

Es así que este trabajo de investigación tiene como objetivo principal evaluar el contenido de *l*-mentol, *l*-mentona y *l*-acetato de mentilo, componentes mayoritarios del aceite esencial

de *Mentha piperita L.*, de mayor relevancia comercial, y que se encuentran en diferentes concentraciones.

Llevando a cabo un protocolo ordenado de obtención del aceite esencial de *Mentha piperita L.* por hidrosdestilación, determinando las características fisicoquímicas del aceite obtenido, para finalmente cuantificar el contenido de los componentes ya mencionados, utilizando una técnica moderna como es la Cromatografía de Gases acoplada a un Espectrómetro de Masas. Teniendo en cuenta los diversos factores que intervienen directa o indirectamente en su rendimiento, composición, concentración, en favor o en contra de las exigencias del mercado.



OBJETIVOS

- I. Extraer Aceite Esencial de *Mentha piperita L.* por Hidrodestilación con Trampa Clevenger.
- II. Determinar las principales características fisicoquímicas del Aceite Esencial de *Mentha piperita L.*
- III. Sintetizar y Purificar los Estándares de *l*-Mentona y *l*-Acetato de Mentilo a partir del Estándar de *l*-Mentol.
- IV. Evaluar el Contenido de *l*-Mentol, *l*-Mentona y *l*-Acetato de Mentilo en el Aceite Esencial de *Mentha piperita L.* por GC-MS.

HIPÓTESIS

Ya que el Aceite Esencial de *Mentha piperita L.* es un producto natural constituido por una mezcla de sustancias diversas, es probable evaluar su contenido de *l*-Mentol, *l*-Mentona y *l*-Acetato de Mentilo que son sus componentes químicos de mayor importancia industrial.



CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. ACEITES ESENCIALES

2.1.1. Breve Reseña Histórica

Los aceites esenciales, son conocidos y utilizados desde la antigüedad en gran número de aplicaciones: perfumes, ambientadores, cosméticos, medicinas, etc. Existen referencias en manuscritos egipcios y chinos y alrededor de 200 citas en la biblia.¹

Aceite esencial fue un término utilizado por primera vez en el siglo XVI por Paracelso (famoso médico y farmacéutico) que los utilizó con medicamentos y los consideró como la quinta esencia o elemento inmaterial presente en todo ser.¹

En los siglos XVI y XVII se prepararon por primera vez en las farmacias de todo el mundo.

En el siglo XIX su demanda creció hasta ser necesaria la industrialización de la producción debido a su uso masivo en perfumes y sabores para alimentación.¹

En 1850 el fuerte impulso de la química orgánica sintética y el análisis de algunos aceites esenciales llevó a la producción de aceite aromático sintético que imitaban a los originales.¹

En la actualidad los métodos analíticos modernos nos permiten identificar de manera exhaustiva los componentes presentes en los aceites esenciales.¹

Por otra parte el uso de los aceites esenciales como sustancias medicinales vive un nuevo impulso, al quedar englobada dentro del gran auge que experimentan los productos naturales desde hace algunas décadas en los países más desarrollados.¹

2.1.2. Definición

Los aceites esenciales son mezclas de sustancia obtenidas de las plantas que presentan como características principales su compleja composición química.²

Es así que los aceites esenciales no son compuestos puros si no mezclas de multitud de sustancias que se encuentran en distintas proporciones y que en conjunto proporcionan al aceite esencial sus características propias.¹

Entre los componentes de los aceites esenciales, una familia de los hidrocarburos, los terpenos es la mayoritaria, llegando alcanzar concentraciones del 75% al 90%, proporcionando su carácter volátil e inflamable y sus propiedades físicas como la densidad y viscosidad.¹

2.1.3. Características Físicas de los Aceites Esenciales

- a) Líquidos a temperatura ambiente.^{1,2}
- b) Volátiles.^{1,2}
- c) Aromáticos.^{1,2}
- d) Incoloros o amarillentos.^{1,2}
- e) Menos densos que el agua (canela y clavo: más denso que el agua).^{1,2}
- f) Insolubles en el agua.^{1,2}
- g) Solubles en disolventes orgánicos.^{1,2}
- h) Solubles en alcoholes de alta graduación.^{1,2}
- i) Extraíbles por arrastre de vapor de agua o expresión.^{1,2}
- j) Poder rotatorio.^{1,2}

2.1.4. Usos de los Aceites Esenciales

El tipo de AE. y su calidad, determina en que producto final será incorporado un aceite. Los aceites esenciales son ampliamente utilizados como materia prima en diferentes tipos de industria. Como la farmacéutica, cosmética, alimenticia, etc.³

La tabla 2.1 muestra los usos y aplicaciones de los aceites esenciales en distintas industrias.

Tabla 2.1: Usos y Aplicaciones de los Aceites Esenciales en distintas Industrias

INDUSTRIAS	APLICACIONES
Alimenticias	Salsas Condimentos Bebidas Alimentos procesados y enlatados
Licorería	Aperitivos Saborizantes
Cosmética	Perfumes Dentífricos Cremas Lociones
Farmacéutica	Antisépticos Analgésicos Saborizantes Homeopatía
Agroquímica	Bioinsecticidas Alelo químicos
Textil	Elaboración de enmascaradores de olor
Petroquímica y minería	Utiliza esencias o terpenos derivados de ellas como vehículos flotantes y lubricantes
Pinturas	Enmascaradores de olores Disolvente biodegradable

2.1.5. Tipos de Aceites Esenciales

- a) **AE.s Crudos:** Son directamente aislados de la planta, sin procesamiento adicional alguno.¹
- b) **AE.s Refinados:** Tienen mayor valor agregado y se utilizan en industria farmacéutica, alimenticia, cosmética y de perfumes.¹

2.1.6. Factores que Influyen sobre la Composición y el Rendimiento de los Aceites Esenciales

La formación de los aceites esenciales en las plantas ha sido objeto de muchos esquemas propuestos como la biogénesis, reacciones químicas, clima, edad de la planta, etc. Siendo entonces estos factores de vital importancia en el proceso de producción de un aceite esencial, por lo que el criterio de calidad de este viene definido mayoritariamente por su composición química y rendimiento. Criterios que necesariamente tiene que ser evaluados.⁴

Los siguientes son los factores que influyen sobre la composición química y el rendimiento del aceite esencial:

- a) **Métodos de cultivo:** fertilizante, abono, distancia de siembra, etc.⁵
- b) **Condiciones geobotánicas:** El clima (cálido y luminoso, lluvioso), altitud (determinante del rendimiento), tipo de suelo (arenosos – arcillosos, humiteros, calcáreos, pH, etc. Por ejemplo en un suelo arcilloso, compacto y seco, el crecimiento de la planta resulta defectuoso y su rendimiento en esencia disminuye), luminosidad, temperatura, etc.⁵
- c) **Época de la recolección:** pre floración, plena floración o floración tardía, factor que determina el bajo contenido o ausencia de precursores químicos de los aceites esenciales, así como el aumento significativo de otros compuestos químicos.^{4,5}
- d) **Partes de la planta de donde se extrae el aceite esencial:** tallos, hojas, flores, raíces. Se sabe que en ciertas familias de plantas en las hojas se encuentra mayor porcentaje de rendimiento de los aceites esenciales.^{4,5}

- e) Edad de la planta, factor predeterminante en la composición química de un aceite esencial, determina la edad de un aceite.^{4,5}
- f) Temperatura y formas de secado (al ambiente o temperaturas mayores a los 50 °C producidas por maquinas industriales) de las plantas.^{4,5}
- g) Método de extracción del aceite: destilación, extracción con solventes, extracción con fluido supercrítico, etc.^{4,5}

2.1.7. Composición Química

Considerando al aceite esencial como un producto de aroma característico y clasificando su composición sobre la base de esta propiedad, se puede afirmar que un aceite esencial es una mezcla de sustancias constituida fundamentalmente por una base integrada por hidrocarburos terpénicos. En menor concentración se encuentra un número no muy alto de sustancias químicas volátiles que son responsables principales del aroma global del aceite esencial.¹

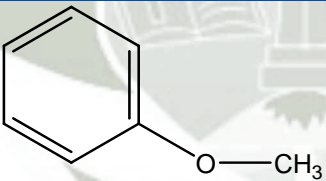
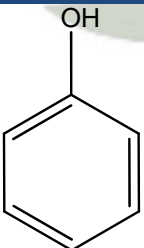
La composición química de los aceites esenciales depende también de factores como el origen botánico, condiciones ambientales, características de cultivo, etc.⁵

De manera general los compuestos presentes en los aceites esenciales pueden agruparse en:

- a) **No terpenoides:** En este grupo tenemos sustancias alifáticas de cadena corta, sustancias aromáticas, sustancias con azufre y sustancias nitrogenadas. No son tan importantes como los terpenoides en cuanto a sus usos y aplicaciones.¹
- b) **Terpenoides:** Son los más importantes en cuanto a propiedades y comercialmente. Los terpenos derivan, de unidades de isopreno (C5) unida en cadena. Los terpenos son una clase de sustancia química que se halla en los aceites esenciales, resinas y otras sustancias aromáticas de muchas plantas. Principalmente encontramos en los aceites monoterpenos (C10), aunque también son comunes los sesquiterpenos (C15) y los diterpenos (C20). Pueden ser alifáticos, cíclicos o aromáticos.¹

Lo que se expresa en la tabla 2.2.

Tabla 2.2: Grupos Funcionales de los Compuestos Químicos de los AE.

COMPUESTO	GRUPO FUNCIONAL	EJEMPLO	PROPIEDADES
Alcohol	OH	Mentol	Antimicrobiano Antiséptico Tonificante
Aldehído	CHO	Citral	Espasmolítico Sedante Antiviral
Cetona	C=O	Alcanfor	Mucolítico Regenerador celular Neurotóxico
Ester	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}'-\text{C}-\text{OR}' \end{array}$	Metil salicilato	EspasmolíticoSedativo Anti fúngico
Éteres	$\begin{array}{c} & & \\ -\text{C} & -\text{O}- & \text{C}- \\ & & \end{array}$	Cineol	Expectorante
Éter fenólico		Anetol	Diurético, Carminativo Estomacal
Fenol		Timol	Antimicrobiano, Estimulante Inmunológico
Hidrocarburo	Solo contiene C y H	Pineno	Descongestionante, Antivírico, Antitumoral.

a. Hidrocarburos Monoterpénicos³

Son los compuestos más abundantes en los aceites esenciales, y precursores de los más complejos, que son los terpenos oxidados. Se denominan terminando en – eno.

Por ejemplo el limoneno es el precursor de los principales componentes de la esencia de las mentas (*Mentha* spp., F. Lamiaceae), como carvona y mentol. El limoneno se encuentra también en cítricos y en el eneldo, *Anethum graveolens* (F. Apiaceae).

b. Alcoholes³

Los alcoholes llevan el grupo hidroxilo (- OH) unido al esqueleto C₁₀. Se denominan terminados en (- ol). Son muy apreciados por su aroma.

Por ejemplo, el linalol, que tiene dos formas, el R-linalol se encuentra en la rosa y la lavanda y es el componente mayoritario de la *Mentha arvensis*. La forma S-linalol en el aceite de lavanda con un contenido > 5% indica adulteración.

c. Aldehídos³

Los aldehídos son compuestos muy reactivos. Se nombran acabados en (- al). Muchos de ellos, por ejemplo los encontrados en los cítricos, se corresponden con su respectivo alcohol, por ejemplo, geraniol – geranial o citronelol – citronelal.

Son abundantes en los cítricos, responsables del olor característico, principalmente los isómeros geranial (α citral) y neral (β citral) juntos conocidos como citral.

d. Fenoles³

Sólo se encuentran en unas pocas especies pero son muy potentes e irritantes. Los más importantes son el timol y el carvacrol, que se encuentran en los tomillos (g. *Thymus*) y oréganos (g. *Origanum*), ambos de la Fam. Labiatae.

e. Éteres fenólicos³

Son los componentes principales de especias como el apio y el perejil (apiol), anís (anetol), albahaca (metilchavicol) y estragón (estragol).

f. Cetonas³

Se producen por la oxidación de alcoholes y son moléculas bastante estables. Terminan en –ona. La carvona está presente en la *Mentha spicata*.

La tuyona (aislada por primera vez en la Tuya, *Thuja occidentalis*, F. Cupressaceae) y pulegona son bastante tóxicas y nunca deben usarse en el embarazo.

h. Ésteres³

La mayoría de los éteres se forman por reacción de un alcohol terpénico con ácido acético. Su aroma caracteriza a los aceites en los que se encuentran.

Por ejemplo, el aceite de lavanda contiene linalol y su éster, acetato de linalilo. La abundancia relativa de estos dos compuestos es un indicador de buena calidad.

2.1.8. Biogénesis de los aceites esenciales

En las plantas se presentan unas vías metabólicas particulares, no existentes en los animales, por las cuales se pueden producir grandes cantidades de compuestos de naturaleza química conocida. El conjunto de estas vías metabólicas recibe el nombre de metabolismo secundario.^{1,7}

- a) Cabe señalar que, los productos de este proceso de biosíntesis, en general cumplen con las siguientes funciones:¹
- No juegan rol en el metabolismo primario.
 - Tiene una distribución restringida.
 - La principal función de algunos de ellos es la defensa contra el ataque de insectos y patógenos.

- Se acumulan en grandes cantidades sin efectos negativos en las células o en las plantas.
- b) Metabolismo de las plantas:** el metabolismo secundario se puede definir como la biosíntesis, transformación y degradación de los compuestos endógenos mediante proteínas.⁷
- Según las vías biosintéticas que les dan su origen, los metabolitos se dividen en tres grupos: (1) Terpenos, (2) Compuestos fenólicos (3) Nitrogenados, que se obtiene a partir de vías de síntesis relacionadas con rutas degradativas del metabolismo primario de las plantas.⁷



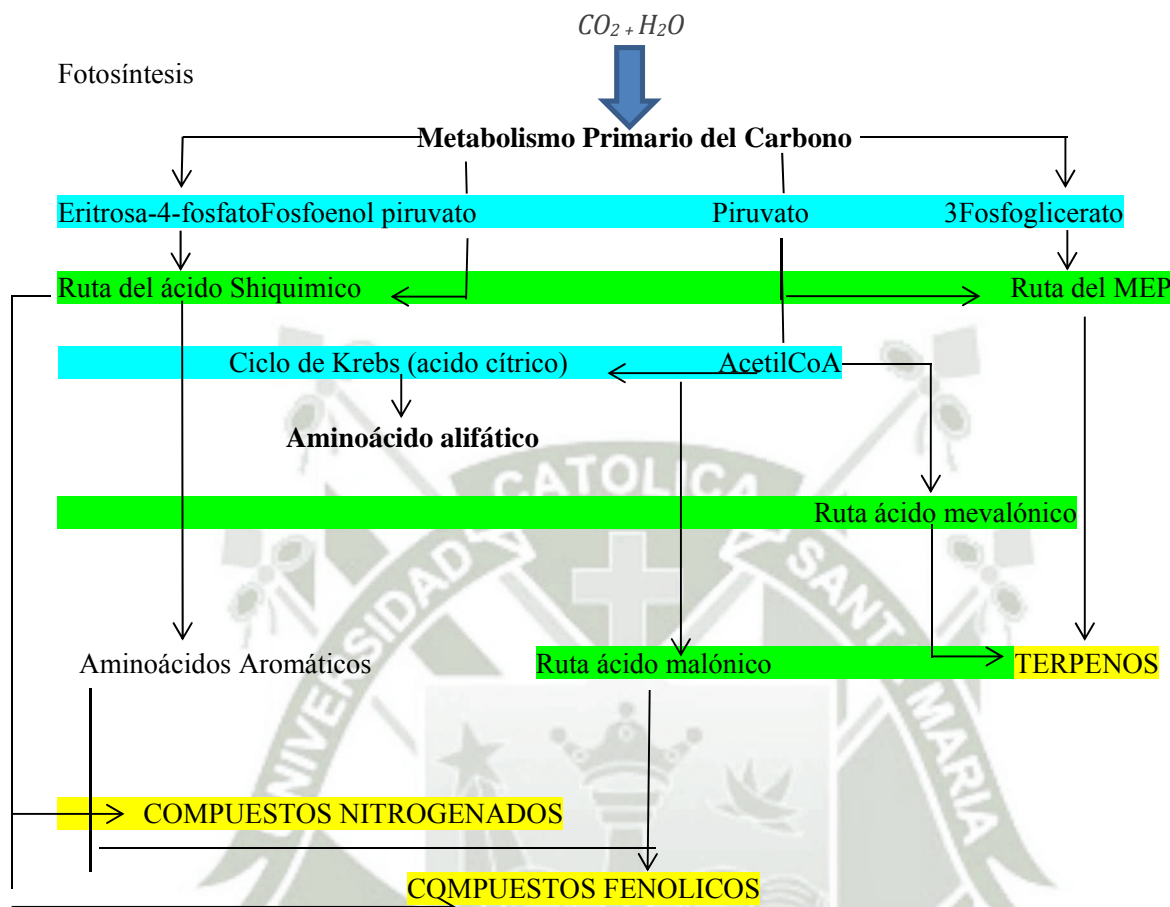


Fig. 2.1: Interconexión de los principales grupos de metabolitos secundarios y su relación con la fotosíntesis.⁷

c) Compuestos Terpénicos: La biosíntesis de los terpenos depende de un número variable de condensaciones del isopreno (2-metil-1,3-butadieno).⁷

Existen dos rutas biosintéticas para la formación de terpenos:⁷

i. **Ruta del Ácido Mevalónico:** Se lleva a cabo en el citosol.

El intermediario en esta vía es el ácido mevalónico, el cual es formado por la reducción enzimática de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA), la cual es a su vez formada por la condensación de la acetil coenzima

A y acetoacetyl coenzima A. Dos fosforilaciones sucesiva del ácido mevalónico, y la posterior eliminación del grupo hidroxil y carboxil dan lugar al IPP⁵.

Esta vía biosintéticas se muestra a continuación en la figura 2.2.

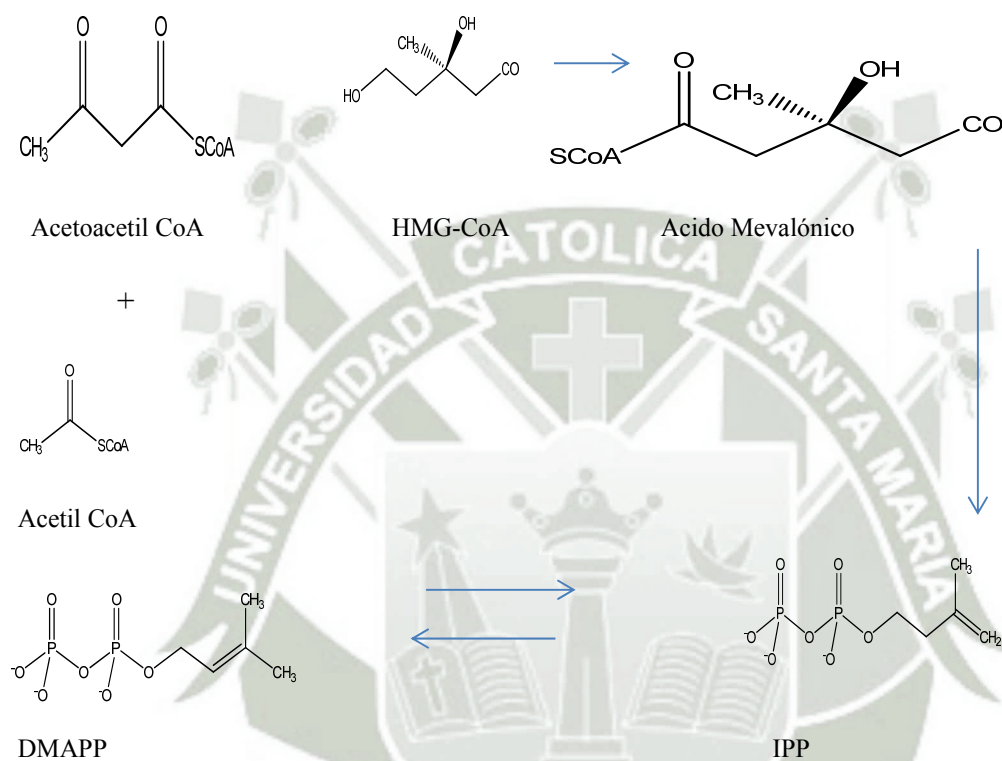


Fig. 2.2: Ruta del Ácido Mevalónico para la formación de terpenos

ii. **Ruta del MPE (metileritritol-4-fosfato):** Se lleva a cabo en los plastidios.

El IPP proviene de la 1-deoxixilulosa-5-fosfato (1-DXP), esta última proviene de los intermediarios glicolíticos; gliceraldehido-3-fosfato y piruvato. El paso fundamental en esta vía, es la reducción y reordenamiento de 1-DXP para formar 2C-metileritritol-4-fosfato (MEP) usando como cofactor al NADH.⁷

MEP se convierte en IPP por una serie de reacciones químicas que llevan a la formación del intermediario(E)-4-hidroxi-3-metilbut-2-enil pirofosfato (HMBPP) y la remoción de agua.⁷

2.1.9. Obtención de Aceites Esenciales

Los aceites esenciales se extraen de los tejidos mediante diversos procedimientos físicos y químicos, en función, principalmente de la parte de la planta en las que se encuentran (pétalos, raíces, tallo, ramas, semillas, savia, hojas), así como la posibilidad de descomponer estos compuestos.¹

a) **Destilación:** La destilación es una de las principales técnicas para separar mezclas de líquidos. La separación se fundamenta en la diferencia de la presión de vapor de los diferentes componentes de la mezcla. Al calentarse la mezcla los componentes se evaporan para condensarse posteriormente y durante el proceso, el vapor (y por lo tanto el condensado) se enriquece con los componentes más volátiles.⁸

De manera general la destilación es una técnica general usada para remover un solvente, purificar un líquido o separar los componentes de una mixtura de líquidos.⁹

Los tipos de destilación más común son destilación simple, destilación fraccionada y destilación por vacío.⁹

b) **Expresión del pericarpio:** Esta técnica se aplica a los frutos de los cítricos para conseguir el aceite esencial, lugar donde se encuentran las glándulas que contiene las células productoras del aceite rellenas con protoplasma, la materia proteínica responsable de los procesos químicos en el interior de las células.^{1,7}

La técnica tiene como variantes la escarificación y la presión superficial lateral o expresión de la corteza, ambas de aplicación manual. Cada uno de estos procesos libera aceite esencial y protoplasma desde las glándulas rotas, la cual posteriormente es lavada medianamente con una corriente de agua o sometida a la centrifugación para recuperar el aceite. Además durante la producción, la concentración de un aceite cítrico exprimido, inevitablemente, entran en contacto con el agua, con el oxígeno del aire, y con enzimas capaces de acelerar enormemente diversas reacciones oxidativas e hidrolíticas.⁷

- c) **Disolución en grasa (*enfleurage*):** Los aceites son solubles en grasas y alcoholes de alta graduación. Sobre una capa de vidrio se coloca una fina película de grasa y sobre ella los pétalos de flores extendidas. La esencia pasa a la grasa, así hasta saturación de la grasa. Posteriormente con alcohol de 70°, se extrae el aceite esencial. Se emplea para flores con bajo contenido en esencias pero muy preciadas (azahar, rosa, violeta, jazmín).^{1,7}
- d) **Extracción con disolventes orgánicos:** que penetran en la materia vegetal y disuelven las sustancias, que son evaporadas y concentradas a baja temperatura. Después, se elimina el disolvente, obteniendo la fracción deseada. La selección del disolvente pretende que sea capaz de disolver rápidamente todos los principios y la menor cantidad de materia inerte, que tenga un punto de ebullición bajo y uniforme que permita eliminarlo rápidamente, pero evitando pérdidas por evaporación, químicamente inerte, para no reaccionar con los componentes de los aceites, no inflamable y barato. Este disolvente ideal no existe, y los más empleados son el éter de petróleo, con punto de ebullición de 30 a 70 °C, que se evapora fácilmente y es inflamable, benceno, que disuelve también ceras y pigmentos, y alcohol, que es soluble en agua. Se emplea cuando hay componentes de peso molecular elevado que no son lo suficientemente volátiles.¹
- e) **Extracción con gases en condiciones supercríticas:** Se emplean gases, principalmente CO₂, a presión y temperatura superiores a su punto crítico. En esas condiciones se obtienen buenos rendimientos y se evitan alteraciones de los componentes de la esencia. La infraestructura necesaria es cara, pero tiene sus ventajas, como la fácil y rápida eliminación del gas extractor por descompresión, la ausencia de residuos de disolventes y que los gases no resultan caros.¹

2.1.10. Método de Destilación de Aceites Esenciales

La obtención de los aceites esenciales es realizada comúnmente por la tecnología llamada de destilación por arrastre de vapor, en sus diferentes modalidades. La pureza y el rendimiento del aceite esencial dependerán de la técnica que se utilice para su aislamiento.

a) Destilación por Arrastre de Vapor

Es llamada también destilación por arrastre de vapor, extracción por arrastre, hidrodifusión, hidroextracción o **HIDRODESTILACIÓN**. Sin embargo, no existe un nombre claro y conciso para definirla, debido a que se desconoce que pasa exactamente en el interior del equipo principal y porque se usan diferentes condiciones del valor de agua para la obtención.¹⁰

Es así que cuando se usa vapor saturado o sobrecalentado, fuera del equipo principal, es llamado **“DESTILACIÓN POR ARRASTRE DE VAPOR”**.¹⁰

Cuando se usa vapor saturado, pero la materia prima está en contacto íntimo con el agua que genera el vapor se le llama **“HIDRODESTILACIÓN”**.¹⁰

b) Hidrodestilación

El material está en contacto íntimo con el agua generadora del vapor. En este caso se ponen en el mismo recipiente el agua y el material a extraer, se calientan a ebullición y el aceite extraído es arrastrado junto con el vapor de agua hacia un condensador, que enfría la mezcla, la cual es separada posteriormente para obtener el producto deseado.¹¹

c) Hidrodestilación Clevenger:

El Equipo Clevenger es usado en muchos laboratorios y considerado en varios estándares internacionales, como el más adecuado para obtención de aceite esencial de una planta aromática.^{10, 12}

Está compuesto de un balón donde se deposita la materia prima molida y una cantidad conocida de agua pura. Se le calienta constantemente, el aceite esencial con el agua presente se evaporan continuamente. Un condensador va acoplado al balón y una conexión en forma de D, permite acumular y separar el aceite esencial de la mezcla condensada. El agua floral condensada regresa al balón por el rebose de la conexión.^{10, 12, 13}

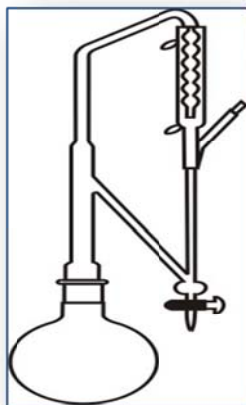


Fig.2.3: Equipo Clevenger

Cuando destilamos plantas aromáticas con la finalidad de obtener aceites esenciales debemos tener en cuenta las siguientes consideraciones:

a. Tratamiento del Material de la Planta: Tener en cuenta los siguientes factores:

- **Reducción del tamaño de la planta:** Los aceites esenciales se encuentran contenidos dentro de glándulas grasas, venas, sacos de aceite o pelos glandulares en las plantas aromáticas. Si el material de la planta se dejara intacto, los aceites serían removidos (evaporados) por el vapor solo después que ellos hayan pasado a través de los tejidos de la planta y se expongan a la superficie. Para evitar esto, el material debe ser triturado, desintegrado, cortado, molido, etc. antes de su destilación, de tal manera que ahora el aceite volátil estará expuesto será llevado con el paso del vapor. La destilación de la planta después del triturado debe ser inmediatamente para evitar que se evapore parcialmente.¹⁰
- **Almacenamiento del Material de la Planta:** El almacenamiento de la planta antes de su trozado debe ser en condiciones óptimas como atmósfera

seca, baja temperatura y un ambiente libre de circulación de aire para evitar la oxidación y rezonificación de los aceites esenciales.¹⁰

- **Pérdida de Aceite Esencial en el Material de la Planta antes de la Destilación:** El aceite volátil contenido en el tejido de la planta es de algún modo, afectado por el secado de la planta después de su cosecha. La pérdida del aceite durante el periodo de marchitez y secado de la planta es mucho mayor a la pérdida ocurrida durante el almacenamiento del material de la planta después de esta ha sido secada. Esto puede ser explicado por el hecho de que durante estas primeras etapas la planta retiene una gran cantidad de humedad en las células, la cual lleva por difusión el aceite a la superficie y ayuda a su evaporación. Una vez que la humedad ha desaparecido y la planta se ha secado, la hidrodifusión ya no puede ocurrir.¹⁰
- **Cambio de la Propiedades Físico-Químicas de los Aceites Esenciales durante el Secado de la Planta:** Aceites esenciales destilado de partes frescas o secas de la planta, muestran una amplia variación en sus propiedades físico-químicas y su composición química. Esto es especialmente cierto en flores, hojas, hierbas y raíces, las cuales en su estado fresco contienen mucho mas humedad.¹⁰

b. Factores que acompañan una Destilación

- **Difusión de Aceites Esenciales y Agua caliente a través de la Membrana de las Plantas:** Después que el material de la planta ha sidotrozado, solo una parte del aceite esencial está presente en las superficies e inmediatamente disponible para su evaporación. El resto del aceite llega a la superficie solo después de difundir a través de una pared (diafragma), se aplica el término “libre difusión”, si la difusión se realiza a través de una membrana permeable, se llama osmosis.¹⁰

La destilación de material de la planta está relacionada a procesos de difusión y principalmente de ósmosis. La destilación ofrece buenas condiciones para la ósmosis del aceite, porque la alta temperatura y el movimiento del agua, causado por las fluctuaciones de presión y temperatura

dentro del destilador, aceleran las fuerzas de difusión hasta un punto tal que todo el aceite volátil contenido dentro del tejido de la planta puede ser colectado. A la temperatura de ebullición del agua, una pared del aceite volátil se disuelve en el agua resiente dentro de las glándulas de la planta. Esta solución de aceite en agua fluye por ósmosis, a través de las membranas hinchadas y finalmente llega a la superficie, donde el aceite es evaporado por el paso del vapor. La velocidad de la evaporación del aceite en la destilación de la planta, está influenciada no tanto por la volatilidad de los componentes del aceite, si no por su grado de solubilidad en agua. Todos los aceites esenciales son solubles en agua caliente, aunque sea en un grado ligero.¹⁰

- **Efecto de la Hidrólisis en la Destilación de la Planta:** En presencia de agua y particularmente a elevada temperatura, los ésteres tiene a reaccionar con el agua para formar los ácidos y los alcoholes originales. Consecuentemente, si la cantidad de agua es grande, y existen las condiciones ácidas, se obtendrán cantidades significativas de alcohol y ácido. La hidrólisis tomará así, una gran extensión.¹⁰
- **Efectos del Calor de Destilación de Plantas:** Prácticamente todos los constituyentes de los aceites esenciales son de algún modo inestables a temperaturas altas. Con el fin de obtener la mejor calidad el aceite, es necesario asegurarse que durante la destilación, los aceites esenciales (oel material de la planta) sean mantenidos a bajas temperaturas o en todo caso que sean mantenidos a altas temperaturas por el menor tiempo posible.¹⁰

2.1.11. Rectificación de Aceites Esenciales

Es el proceso más común, consiste en fraccionar en una columna de rectificación obteniéndose porciones que son analizadas individualmente. Aquellas que tengan una misma calidad se juntan. Generalmente un AE. se fracciona en tres partes.⁷

- a) Cabeza o fracción liviana
- b) Corazón o parte media
- c) Fracciones pesadas

2.1.12. Fraccionamiento

Es la separación del aceite volátil en varias fracciones según sus puntos de ebullición. En la mayoría de los casos se obtiene por destilación al vacío.⁹

- a) **Destilación al Vacío:** Como su nombre lo insinúa la destilación al vacío (simple o fraccionada), crea un vacío parcial dentro del sistema con la finalidad de destilar sustancias por debajo de su punto de ebullición normal. Por lo tanto sirve para destilar sustancias con un alto punto de ebullición, y también nos permiten purificarlas.⁹

2.1.13. Desterpenado de Aceites Esenciales.

Se basa en el refinamiento del aceite esencial que consiste en redestilar el producto al vacío. Este proceso a su vez concentra el contenido de componentes importantes de los productos. Los terpenos y sesquiterpenos no solo son de poco valor para la fuerza y el carácter de los aceites, sino que también se oxidan y polimerizan rápidamente en reposo para formar compuestos de un sabor fuerte y semejante a la trementina.⁷

2.2. *Mentha piperita L.*



Fig.2.4: Plantas de *Mentha piperita* L.

2.2.1. Taxonomía¹⁴

REINO : VEGETAL
DIVISIÓN : FANEROGAMAS
CLASE : DICOTILEDONEAS
ORDEN : SUPEROVARICAS
FAMILIA : (Labiada)
GÉNERO : LAMIACEAE
ESPECIE : *Mentha piperita* L.

2.2.2. Nombres Vulgares¹⁴

Castellano : Menta picante
Italiano : Menta piperita

2.2.3. Etimología⁵

El nombre genérico *Mentha* deriva de la ninfa griega Mintha, enamorada de Zeus, a quien la diosa Persefone, celosa, transformo en planta. El nombre específico deriva de la palabra latina piper, pimienta, por el sabor picante de su esencia.

2.2.4. Origen¹⁴

Centro de origen: Europa y África del Norte, con amplia presencia en Asia y América.

2.2.5. Descripción Botánica

La menta piperita es un híbrido de la menta acuática a sándalo de agua (*M. aquatica L.*) y de la menta romana, menta de espiga o hierbabuena (*M. viridis L. = M. spicata L.*); como esta última es, a su vez, probablemente, un híbrido de dos mastranzos, el común (*M. rotundifolia L.*) y el nevado (*M. longifolia.L = M. sylvestris L.*, resulta que la *M. piperita* es el resultado de una triple hibridación natural.⁵

Es una planta herbácea, vivaz, de tallos erectos cuadrangulares, muy ramificados que puede alcanzar los 80 cm de altura. Las hojas opuestas, pecioladas, con bordes aserrados, de color verde oscuro en la cara superior y más claro en la cara inferior. Los estolones, de sección cuadrangular, crecen bajos y sobre la superficie de suelo en todas las direcciones.

Existen más de 25 especies de menta, tanto silvestres como domésticas. La mayoría de las especies son perennes. Las mentas son ricas en aceites volátiles de composición variada.⁵

2.2.6. Composición Química

Las hojas contienen de 10 a 12 % de elementos minerales, flavonoides, ácidos fenólicos, taninos.¹⁴

Contiene de 0.5% a 1% de aceite esencial^{14,15}

2.2.7. Aceite Esencial de *Mentha piperita L.*

a) El aceite esencial de *Mentha piperita L.* es obtenido de todas las partes de la planta, pero en mayor concentración de las hojas.^{5, 15}

b) Presenta un color amarillo pálido o amarillo verdoso pálido.^{5, 15}

- c) El olor es característico con sensación de frescura.^{5, 15}
- d) Es obtenido generalmente por destilación y rectificado por fraccionamiento para sus diferentes usos.⁵
- e) El AE. de *Mentha piperita L.* es muy usado en comidas, en industria farmacéutica, medicina, cosmética, perfumería, etc. y es uno de los aceites esenciales más producidos por su importancia económica en el mercado internacional.^{5, 15}

2.2.8. Propiedades Funcionales del AE. DE *Mentha piperita L.*

Es usado:

En síndrome de intestino irritado, como antimicrobiano, para las náuseas, como repelente de mosquitos, tratamiento de desórdenes nerviosos y fatiga mental, indigestión, antitusivo, descongestionante nasal, desordenes biliares, aromaterapia con fines de relajación.^{16, 17}

2.2.9. Genotoxicidad y Precauciones

El AE. de *Mentha piperita L.* en humanos induce aberraciones de los cromosomas solo cuando la inhibición de la actividad mitótica es mayor a 70%.

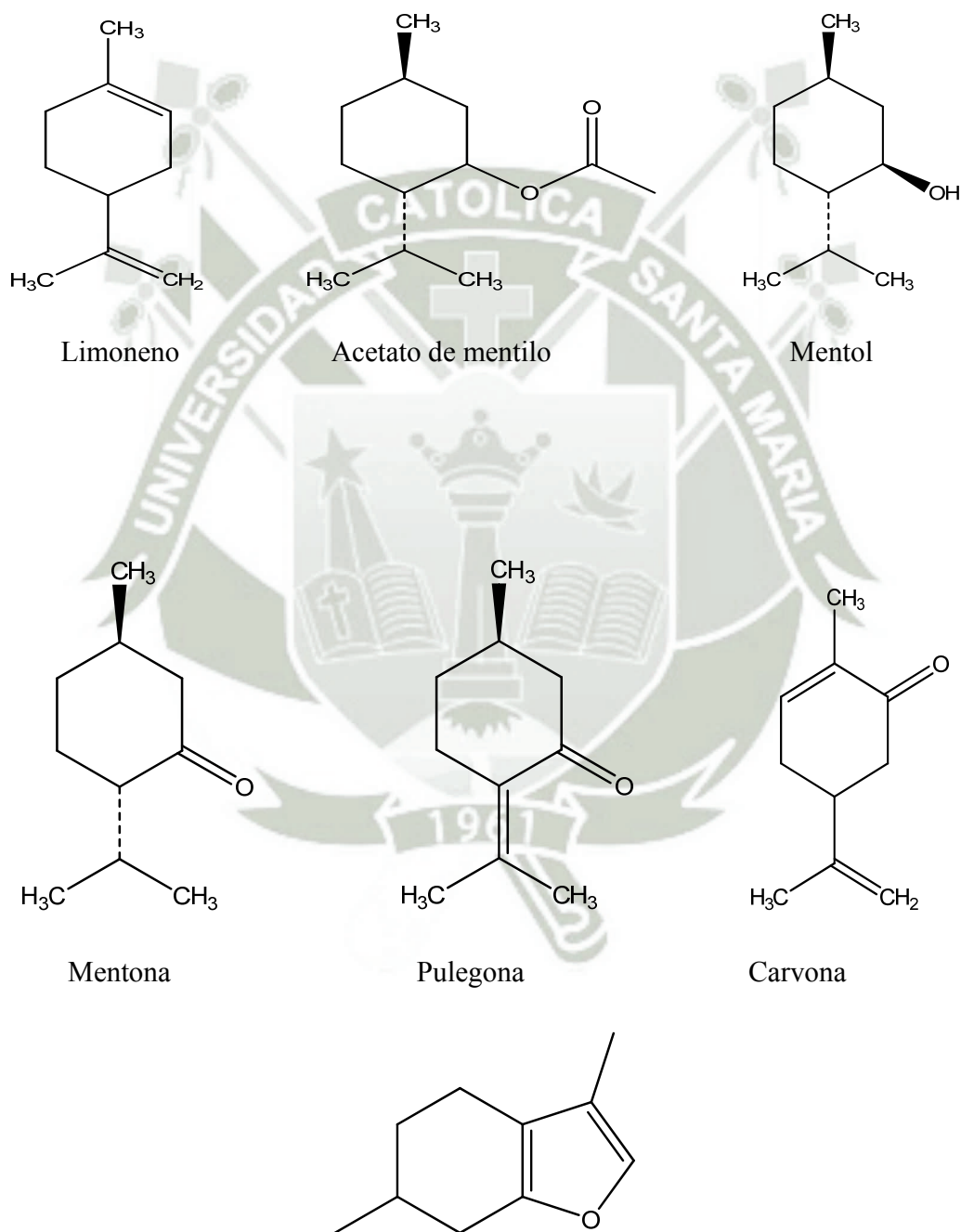
El AE. de *Mentha piperita L.* no es tóxico ni irritante en diluciones bajas, pero la sensibilidad puede ser un problema debido al contenido de mentol. Puede causar irritación de la piel y mucosas, debe ser alejado de los ojos.¹⁶

2.2.10. Constitución Química del AE. de *Mentha piperita L.*

El aceite esencial de *Mentha piperita L.* contiene varios constituyentes: limoneno, cineol, mentona, mentofurano, isomentona, acetato de mentilo, isopulegol, mentol, pulegona y carvona, etc. ¹⁶

Estructuras químicas que se presentan en la figura 2.5

Fig.2.5: Principales Constituyentes Químicos del AE. de *Mentha piperita* L.



Mentofurano

Los compuestos químicos mayoritarios del AE. de *Mentha piperita L.* son el mentol, mentona y acetato de mentilo, pero su concentración en la planta depende de factores endógenos de la planta (biosíntesis) y de factores externos (clima, abono, edad, temperatura, etc.).

a) Mentol: Es un alcohol secundario que se obtiene del AE. De *Mentha piperita L.* o de otras mentas, o preparado sintéticamente a partir de la hidrogenación del timol.

Es un sólido cristalino de densidad 0.89 g/cm^3 , punto de fusión $41-43 \text{ }^\circ\text{C}$, punto de ebullición $212 \text{ }^\circ\text{C}$, poder rotatorio de -50° y un Índice de refracción de 1.458y peso Molecular 156.3 g/mol ^{18,19}

b) Mentona: Es una cetona que se obtiene del AE. de *Mentha piperita L.* o de otras mentas, o preparado sintéticamente a partir del mentol.

Es un líquido de densidad 0.895 g/cm^3 , punto de fusión $-6 \text{ }^\circ\text{C}$, punto de ebullición $207 \text{ }^\circ\text{C}$, poder rotatorio de -24.8° y un índice de refracción 1.450y Peso Molecular 154.3g/mol ^{18, 19}

c) Acetato de Mentilo: Es un éster que se obtiene del AE. de *Mentha piperita L.* ó de otras mentas, o preparado sintéticamente a partir del mentol.

Es un líquido de densidad 0.9 g/cm^3 , punto de ebullición $227 \text{ }^\circ\text{C}$, poder rotatorio -79.42° y un índice de refracción 1.446 y Peso Molecular 198.3g/mol ^{18,19}

2.3. ANÁLISIS Y CONTROL DE CALIDAD DE LOS ACEITES ESENCIALES

Para la utilización de los aceites esenciales es necesario conocer su composición detallada y sus características fisicoquímicas y organolépticas, como parámetros imprescindibles para establecer las normas que determinen sus requisitos mínimos de calidad.²⁰

A estas determinaciones habrá que agregarles los ensayos que aseguren su eficacia y la inocuidad de su uso.

Se debe controlar también la calidad de la materia prima de la obtención de los aceites esenciales: las plantas aromáticas. Bien se comercializan para su consumo en forma directa, ya sea con finalidad medicinal, alimentación, cosmética, etc.²⁰

Las exigencia de control de calidad, difieren según el uso final que se le dará a la planta o al aceite esencial que de ella se obtenga, por lo que no es posible indicar un único control de calidad analítico.²⁰

2.3.1. Drogas Vegetales Aromáticas como Materia Prima²⁰

- a) Las drogas vegetales aromáticas pueden hallarse en el mercado entero o bien troceado con diferentes tipos de corte.
- b) Se pueden transportan en diferentes recipientes (ejemplo: yute, papel)
- c) Cuando se las recepcionan, tras controlar el peso e inspeccionar que su contenido corresponda a lo indicado en los envases contenedores y notas de entrega, así como la ausencia de posibles daños ocasionados durante el transporte (por ejemplo, infestación por insectos, hongos, contaminación cruzada por olores, envases mojados , etc.), deben someterse a un periodo de cuarentena, hasta evaluará su calidad.
- d) De cada lote se efectúa una toma de muestras siguiendo un esquema predeterminado, descrito en algunas farmacopeas o normas específicas, siendo este el más representativo del lote posible.

2.3.2. Objetivos del Control de Calidad de las Drogas Vegetales Aromáticas²⁰

- a) Asegurar la identidad del material, es decir confirmar que corresponda a la parte de la planta y la especie vegetal correspondiente.
- b) Asegurar que se encuentran en las condiciones adecuadas de comercialización por lo que se refieren a su estado de conservación y pureza, es decir, que no a sufrido alteraciones, adulteraciones ni excede los límites de materias extrañas u otros contaminantes.
- c) Asegurar que contiene la cantidad adecuada de aceite esencial, y que su composición es correcta. (En este caso de un uso específico, como medicinal,

cosmético o alimenticio, puede ser conveniente el análisis de otros grupos de principios activos también).

2.3.3. Normas de Calidad para Aceites Esenciales²⁰

a) Para Fragancias

- La calidad está determinada principalmente por las características olfativas.
- La industria de las fragancias suele utilizar patrones propios de referencia, típicos para cada empresa, y a veces para cada producto terminado donde va ser usado.
- Debe destacarse en este ámbito el rol que juegan las normas IFRA (International Fragrance Association), como determinantes de aquellos productos aromáticos que tienen restricciones o prohibición de uso.

b) Para Sabores o Alimentación²⁰

- La calidad depende de su sabor y olor.
- Las normas correspondientes están inscritas en los códigos alimentarios y legislaciones nacionales sobre los alimentos.
- También en este caso debe recalcar las normas IOFI (International Organization of the Flavour Industry), que al igual con las normas IFRA para la industria de fragancias, tratan de regular o restringir el uso de determinadas materias primas, tanto naturales como sintéticas.

c) Para la Industria Farmacéutica y Cosmética²⁰

- La calidad está supeditada a la presencia de constituyentes activos definidos, los que deben ser cuantificados, o a su actividad farmacológica, aunque no se conozca con certeza cual o cuáles son sus principios activos.
- En estos casos solamente se podrá hacer una evaluación a través de su perfil cromatográfico, contra patrón. Las normas están dadas por las Farmacopeas oficiales, tanto nacionales o internacionales (Farmacopea Europea) o herbarias

(como la Farmacopea Ufficiale Italiana (1992) o la British Herbal Pharmacopoeia (1996).

- Cuando el uso es cosmético, las normas mas empleadas son las publicadas por FMA (Fragrance Material Association), IFRA (International Fragrance Association) y las AFNOR (Francia), ISO (Internacionales), o las normas nacionales existentes en muchos otros países.

d) Para uso Industria²⁰

- Se busca disolvente, agente de flotación de minerales, etc.
- Aquí pueden ser parámetros trascendentales la densidad relativa, tipo de destilación, el color, constante dieléctrica, su poder disolvente, sin importar tanto el olor, el sabor o la constitución específica de cada esencia.

2.3.4. Análisis de la Composición de los Aceites Esenciales²⁰

Son mezclas que pueden llegar a ser muy complejas, por lo que la identificación de sus componentes no es una tarea simple.

- Antiguamente esta identificación se convertía en una larga y tediosa operación, que consumía muchísimo tiempo, ya que requería el aislamiento y purificación de cada componente por técnicas combinadas de destilación fraccionada, CCF, cristalización, etc.
- Por ello se usaba comúnmente para el control, la determinación de sus constantes físicas (principalmente solubilidad, densidad, poder rotatorio e índice de refracción) o algunos índices químicos (acidez, de acetilo, fenoles, etc.)
- En las últimas décadas, el desarrollo de técnicas instrumentales de análisis y su acoplamiento a sistemas informáticos y base de datos, ha cambiado sustancialmente el panorama, agilizando de manera notable la identificación de los componentes de las esencias.

Han contribuido especialmente a este cambio el desarrollo de:

- 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 espectroscopia de masas (CG-MS) y la cromatografía de gases acoplada a la espectroscopia infrarroja (CG-IR).

2.3.5. Evaluación de la Concentración de los Aceites Esenciales²⁰

- Para el cumplimiento de las normas de calidad
- La detección de adulteraciones, por ejemplo el agregado de diluyentes, u otros casos el agregado de mentol a esencias naturales de mentas, o el de terpenos cítricos a la esencia de limón.
- Discriminación de calidades: como puede ser diferenciar una esencia de Geranio Europeo de otro 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.
- Como base de datos
- Como aporte científico.

2.3.6. Análisis Realizados para el Control de Calidad de Aceites Esenciales

Dentro de todos los niveles de la cadena productiva de aceites esenciales, el primer control que se realiza, es el de los parámetros organolépticos. Esta prueba se realiza para saber si el AE. presenta adulteración, aunque en otros casos, el comprador puede exigir un análisis químico con el fin de saber la proporción en la cual se encuentran los componentes principales o en el peor de los casos, exigirle a la empresa certificaciones BPM, ISO, etc.^{7,20}

La tabla 2.3 muestra los principales análisis de control de calidad que se le debe realizar a los aceites esenciales.

Tabla 2.3: Análisis que más se utilizan para el Control de Calidad de los AEs:

Características Organolépticas	Determinaciones Físicas	Índices Químicos	Cromatografía Cualitativa-Cuantitativa	Características Espectroscópica
Olor	Densidad	Índice de Acidez	Perfil Cromatográfico	UV
Sabor	Poder Rotatorio		por GC	IR
Color	Índice de Refracción		CCF	

2.4. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

La cromatografía se define como la separación de una mezcla de dos o más compuestos por distribución entre dos fases, una de las cuales es estacionaria y la otra una fase móvil. Varios tipos de cromatografía son posibles, dependiendo de la naturaleza de las dos fases involucradas: sólido-líquido (capa fina, papel o columna), líquido-líquido y gases-líquido (fase vapor).²¹

Todas las técnicas cromatográficas dependen de la distribución de los componentes de la mezcla entre dos fases inmiscibles: una fase móvil, llamada también activa, que transporta las sustancias que se separan y que progresa en relación con la otra, denominada fase estacionaria. La fase móvil puede ser un líquido o un gas y la estacionaria puede ser un sólido o un líquido.²¹

Todos los sólidos finamente pulverizados tienen el poder de adsorber en mayor o menor grado otras sustancias sobre su superficie; y, similarmente, todas las sustancias pueden ser

adsorbidas, unas con más facilidad que otras. Este fenómeno de adsorción selectiva es el principio fundamental de la cromatografía.²¹

2.4.1. Cromatografía De Capa Fina (CCF).

- En este caso se utiliza una placa recubierta con fase estacionaria manteniendo un pequeño espesor constante a lo largo de la placa. El eluyente ascenderá, por capilaridad, por la placa y arrastrará los componentes a lo largo de ésta produciendo “manchas” de los componentes.^{22,23,24}
- Se usan láminas de: vidrio como soporte del adsorbente, plástico (ej.: acetato) ó metálicos (ej.: aluminio). Los tamaños de la placa para CCF. convencional son: 20 x 20; 10 x 20 y 5 x 2.18²³
- Hay placas que contienen un indicador de fluorescencia, para facilitar la identificación de las muestras. Si no se usa indicador y los componentes no son coloridos se requerirán técnicas de revelado.²³

a) Eluyentes más comunes para cromatografía en capa fina.²³

- éter de petróleo
- tolueno
- dietil-éter, t-butil-éter
- diclorometano
- acetato de etilo
- n-pentano, n-hexano
- ciclohexano
- tetracloruro de carbono
- éter dietílico
- cloroformo
- acetona
- iso-propanol

- etanol
- metanol
- ácido acético

b) Reveladores más comunes para Cromatografía en Capa Fina

Las manchas de color son, por supuesto, inmediatamente visibles; las incoloras pueden revelarse mediante:

- Luz UV: si la sustancia absorbe luz ultravioleta, se puede usar una fase estacionaria impregnada con un indicador fluorescente (F254 ó F366).²³
- La introducción de la placa en vapores de yodo.¹⁸
- El rocío con una solución de agua/H₂SO₄ (dentro de un compartimiento especialmente protegido y bajo una campana de extracción de gases).²³

c) Adsorbentes más comunes para Cromatografía en Capa Fina.²³

- Sílica gel (se utiliza en el 80% de las separaciones)
- Óxido de Aluminio ó Alúmina (ácida, neutra ó básica)
- Celulosa (Nativa o micro-cristalina)
- Poliamidas

d) Concepto de R.F.²³

- R_f es el registro y se define como:
- $R_f = \frac{\text{distancia que recorre la muestra desde el punto de aplicación}}{\text{distancia que recorre el disolvente hasta el frente del eluyente}}$
- El valor de R_f depende de las condiciones en las cuales se corre la muestra (tipo de adsorbente, eluyente, así como las condiciones de la placa, temperatura, vapor de saturación, etc.). Tiene una reproducibilidad de $\pm 20\%$, por lo que es mejor correr duplicados de la misma placa.

2.4.2. Cromatografía de Gases

A. Antecedentes/Historia

La cromatografía es un método físico de separación en el cual los componentes a ser separados son distribuidos entre dos fases, una de las cuales es estacionaria mientras que la otra se mueve en dirección definida. Los componentes son separados por sus diferentes tasas de migración. La cromatografía puede ser clasificada por su utilidad y en base al material que se utilice como eluyente para separar los solutos. De acuerdo a su utilidad la cromatografía se clasifica en: analítica, utilizada para determinar los químicos presentes en una mezcla y en que concentración, y preparativa, utilizada para purificar grandes cantidades de químicos.²¹

- La primera técnica cromatográfica fue ideada por un botánico ruso Mikhail Tswett en 1906, quien utilizó alúmina para separ los pigmentos coloreados de las hojas de las plantas, Tswett en su experimento original, metió dentro de una columna de vidrio un fino polvo (sacarosa) para producir una columna de altura deseada. Posteriormente extrajo los pigmentos de las hojas y las colocó en un solvente (éter de petróleo) y agregó un poco de la solución dentro de la columna. Cuando toda la solución había pasado a través de la columna, los pigmentos se iban separando individualmente. La clave del éxito de la columna de Tswett, fue la aplicación de la mezcla dentro de la columna en una zona inicial estrecha y la posterior aplicación del solvente fresco.²¹

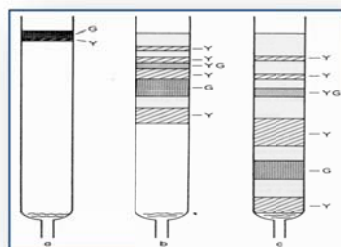


Fig. 2.6: Columna Cromatográfica de Tswett

- En 1931, fue redescubierta por Richard Kuhn al utilizarla para el análisis de polienos.²¹
- Los primeros en utilizar un gas como fase móvil fueron A.T. James y A.J. Martin en 1952, para separar ácidos grasos cortos.²¹
- Posteriormente Daabrio en 1971, la utilizo para separar metilaminas, aminas alifáticas y homólogos de la piridina.²¹

B. Fundamentos Teóricos

Se han propuesto muchas teorías con complejos modelos matemáticos para explicar el comportamiento de los solutos en las columnas cromatográficas. Las más estudiadas son:

i. Teoría de las Placas Teóricas (theoretical plates theory)

Es la principal, la cual plantea que una columna cromatográfica está constituida por una serie de placas contenidas en la fase estacionaria. Supone como constante el volumen de la fase estacionaria en cada placa; que el volumen de fase móvil entre placas es constante; que las dos fases están en equilibrio en cada placa, y que el valor de coeficiente de distribución es constante e independiente de la concentración del soluto. Desventaja: además de que se basa en muchas suposiciones, la principal desventaja es la falta de conexión entre la eficiencia de la columna y las propiedades fisicoquímicas de la partícula.²¹

La ecuación de esta teoría

$$N=16(tr/w)^2$$

N= número de placas teóricas, adimensional

tr= tiempo de retención de un compuesto, minutos

w= ancho del pico a media altura, minutos

ii. Teoría Cinética²¹

Considera el comportamiento en un proceso cromatográfico en función de los factores cinéticos que intervienen:

- Variaciones en las velocidades de flujo, debido a las diferentes rutas que puede tomar el analíto durante su migración a través del empaque.
- Difusión axial o longitudinal del soluto en la fase móvil.
- Resistencia a la transferencia de masas entre la fase móvil y la fase estacionaria.
- La ecuación de Van Deemter:

$$\text{HETP o } H = A + B/u + Cu$$

HETP o h = altura equivalente a una placa teórica, milímetros.

$u = L / t_r$ aire promedio de la velocidad lineal, cm/seg

$A = 2\lambda dp$ difusión aparente

$B = 2\gamma D_m$ coeficiente del término debido a la difusión molecular

$C = (8/\pi)(k'/[1+k']^2)(df/D_s)$ coeficiente del término debido a la resistencia a la transferencia de masas.

iii. Teoría para las Columnas Capilares

Se considera que la difusión aparente no contribuye de manera apreciable al ensanchamiento de los picos en este tipo de columnas. El coeficiente relacionado con la difusión molecular tiene un valor de uno debido a que la distancia que recorre la partícula es igual a la longitud de la columna. El término relacionado con la transferencia de masas viene dado en función del diámetro de la columna, pues en este tipo de columna es más importante que el tamaño de partícula de relleno.

La ecuación de esta teoría es un caso particular de la ecuación de la teoría cinética, en este caso se omite el término A pues su valor es despreciable; se relacionan las magnitudes que caracterizan la geometría del soporte y el

término C se presenta de manera distinta pues en este tipo de columna es más importante la fase móvil que el tamaño de partícula.²¹

Circulación del gas portador

La ley de Darcy correlaciona la velocidad lineal de un gas que circula por una columna con el gradiente de presión.

$$u = - (k/\eta) (dP/ dz)$$

u= velocidad lineal en un punto de la columna

z=distancia a la entrada de la columna

η = viscosidad del gas

dP= gradiente de presión de un elemento

dz= longitud de columna

k=constante de permeabilidad.

C. Terminología

Coefficiente de reparto (K)

Propiedad termodinámica del sistema soluto-fase estacionaria-fase móvil independiente del proceso cromatográfico. Concentración de soluto en la fase estacionaria frente a concentración de soluto en fase móvil a temperatura constante.^{25,26}

Factor de capacidad (k')

Depende de las propiedades termodinámicas del sistema (K) y además es función de las características de la columna en particular. Probabilidad de encontrar una molécula determinada de soluto en la fase estacionaria o en la fase móvil.^{25,26}

Relación frontal (Rf)

La relación frontal y el factor de capacidad son dos maneras de medir el mismo fenómeno.

Representa la relación entre las velocidades medias del soluto y la fase móvil en su recorrido por la columna.^{25,26}

Tiempo muerto (t_m)

Es el tiempo de retención de una sustancia insoluble en la fase estacionaria ($K=0$).

Resolución R_s

Cada sustancia se desplaza a una velocidad característica dada por el valor de su relación frontal en dichas condiciones. Altura equivalente a una placa teórica. Por tratarse de un método donde se separa por elución es mejor referirse a tiempo de elución más que a distancias recorridas.^{25,26}

Eficacia

Una columna será más eficaz mientras mayor sea el número de placas teóricas que tenga. Para poder hacer comparaciones entre columnas es necesario establecer condiciones similares de trabajo.^{25,26}

D. Funcionamiento de un Cromatógrafo de Gases

En resumen, un cromatógrafo de gases funciona de la siguiente forma: un gas inerte fluye en forma continua desde un cilindro de gas a través del inyector, la columna y el detector. La velocidad de flujo del gas carrier se controla para asegurar tiempos de retención reproducibles y minimizar las variaciones y ruidos en el detector. La muestra se inyecta (normalmente con una micro jeringa) en el inyector que se encuentra a alta temperatura donde se vaporiza y es transportada a la columna, en general de 15 a 30 m de largo, cubierta en la parte interior por un film de un líquido de alto punto de ebullición (la fase estacionaria). La muestra se reparte entre la fase móvil y la estacionaria de modo de que los componentes individuales se separen en base a su solubilidad relativa en la fase líquida y sus presiones de vapor relativas.²⁷

Luego de la columna, el gas carrier y la muestra pasan a través de un detector, donde se mide la cantidad de cada componente y se genera una señal eléctrica. Esta señal se transmite a un sistema de registro e integración, el cual genera un cromatograma que representa un registro del análisis. En la mayor parte de los casos, el sistema integra automáticamente el área de cada pico, realiza los cálculos e imprime un reporte con los resultados cuantitativos y los tiempos de retención.²⁷

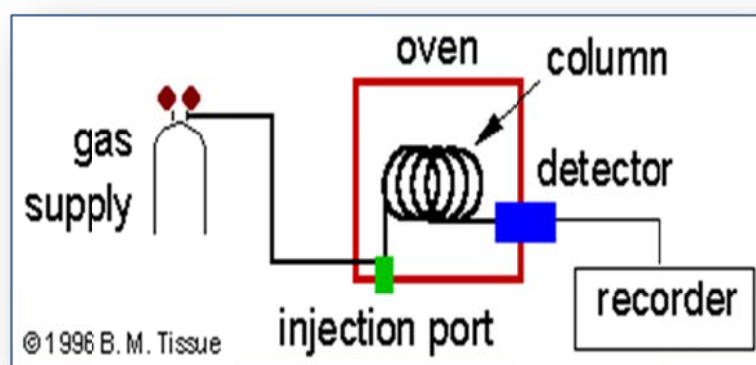


Fig. 2.7: Representación esquemática de un sistema de cromatografía gaseosa

E. Características de las Muestras que pueden ser Analizadas por GC.²⁶

- Gases líquidos o sólidos
- Compuestos orgánicos e inorgánicos
- La muestra debe ser volátil o debe poder ser transformada en volátil.

Estas características determinarán las ventajas y limitaciones de la cromatografía gaseosa, lo que se explica a continuación en la tabla 2.4.

Tabla 2.4: Ventajas y limitaciones de la cromatografía gaseosa

VENTAJAS	LIMITACIONES
Eficiente, permite alta resolución	La muestra debe ser volátil.
Requiere muestras pequeñas (μ l)	No aplica a muestras termolábiles
Alta sensibilidad detecta ppm y ppb	Muestras sucias requieren un “clean up”
Cuantitativa	Se debe utilizar otro sistema de detección (ej.: para confirmar la identificación
Alta velocidad de análisis	Es necesario algo de entrenamiento y experiencia
Buena exactitud	
Fácil de usar, bien conocida	

F. Componentes de un Cromatógrafo de Gases

1. Gas carrier

La función principal del gas carrier es transportar la muestra a través de la columna. Es la fase móvil, debe ser inerte en las condiciones usadas y no debe interactuar químicamente con la muestra. Una segunda función es actuar como una matriz conveniente en el detector para la medida de los componentes en la mezcla.²⁶⁻²⁹

La selección del gas carrier (portador) y su selección dependerán fundamentalmente del tipo de detector utilizado. Los gases más utilizados son N_2 , H_2 , He o Ar. El H_2 tiene la menor viscosidad de todos, lo que significa que su uso es ventajoso en columnas capilares largas en las cuales se requiere flujos relativamente altos. La curva de Van Deemter, que relaciona la altura de plato teórico de la columna con la velocidad de flujo lineal de la fase móvil, a partir de la cual la eficiencia de la columna puede ser optimizada, es muy diferente para el H_2 y N_2 . Como se ve en la

Figura hay un mínimo más achatado para el H_2 , lo que determina una eficiencia de la columna considerablemente mayor a velocidades de flujo altas.²⁶⁻³¹

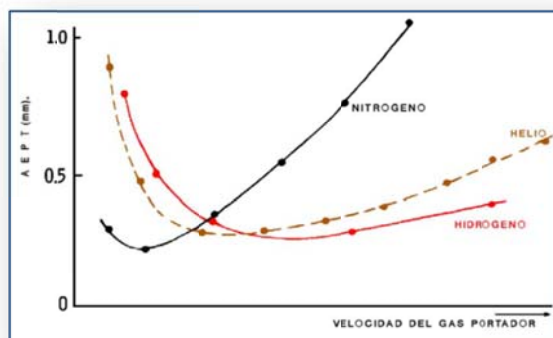


Fig. 2.8: Curva de Van Deemter

a) Control de flujo y su medida

La medida y control del flujo del gas carrier es esencial para lograr una buena eficiencia de separación de la columna y para el análisis cualitativo de las mezclas. La eficiencia de una columna depende de la velocidad lineal del gas, al cual se puede determinar fácilmente cambiando la velocidad de flujo hasta lograr el máximo número de platos (mejor resolución)^{31, 32}

Para el análisis cualitativo de mezclas es esencial tener una velocidad de flujo constante y reproducible de forma que los tiempos de retención también sean reproducibles. La comparación de los tiempos de retención es la técnica más rápida y sencilla para la identificación de componentes. Se debe tener en cuenta de que 2 o más compuestos pueden presentar el mismo tiempo de retención, pero ningún componente puede presentar 2 tiempos de retención diferentes en las mismas condiciones instrumentales. Por lo tanto, el tiempo de retención es una característica de cada soluto, pero no único. Obviamente un buen control de flujo es esencial para este método de identificación.³¹

b) Sistemas de Control de Flujo

El primer sistema de control de flujo está representado por los reguladores de dos etapas conectados a los cilindros de gas carrier, necesarios para reducir la presión del cilindro desde aprox. 2500 psi a un nivel de 20-60 psi.^{31, 32}

Para cromatografía gaseosa isoterma (temperatura del horno constante durante toda la corrida), la presión de entrada constante es suficiente para tener una velocidad de flujo constante, asumiendo que la columna produce una caída de presión constante.

Para cromatografía gaseosa en la que se utilizan programas de temperatura, aun cuando la presión de entrada de la fase móvil es constante, la velocidad de flujo disminuirá a medida de que la temperatura de la columna aumenta. Esta disminución de la velocidad de flujo es debida al aumento de la viscosidad del gas carrier a temperaturas elevadas. En todos los cromatógrafos de temperatura programada, se debe utilizar un controlador diferencial de flujo que asegure una velocidad de flujo constante.^{31, 32}

c) Medidores de flujo

El sistema más común utilizado en la medida de flujo de la fase móvil, está representado por un flujímetro que utiliza burbujas de jabón líquido. Se trata de un tubo calibrado a través del que se permite fluir el gas carrier. Se forman burbujas en el jabón con una pera de goma en la parte inferior del tubo y al pasar el gas desde el cromatógrafo arrastra estas burbujas que recorren una distancia (volumen) en un determinado tiempo indicando una determinada velocidad de flujo (ml/min).^{31, 32}

2. Sistemas de Inyección²⁷⁻³²

La muestra a ser analizada por cromatografía gaseosa puede ser de diferente naturaleza: gases, líquidos y sólidos. En consecuencia, el sistema de inyección debe contemplar estas características y permitir que la muestra sea introducida al cromatógrafo en forma rápida y cuantitativa. Para cada caso, se requiere de

diferentes tipos y tamaños de columnas y por lo tanto se dispone de diferentes sistemas de inyección. Para los fines de esta discusión, se considerarán sólo columnas capilares y el sistema de inyección más frecuente, que involucra la aplicación de un divisor (sistema split) de flujo, o la eliminación del mismo (sistema splitless).

Mientras que la inyección de la muestra en columnas empacadas normalmente no presenta problemas, una forma de introducir cantidad una pequeña y definida de muestra en una columna capilar, consiste en utilizar el sistema “split”, es decir que sólo una cierta cantidad de la muestra inyectada llega a la columna. Esta cantidad se determina por la relación de split, la cual normalmente se encuentra en el rango 1:20-1:200. Dado que el sistema de “*split-injection*” puede provocar discriminación de los componentes de mayor punto de ebullición, no siempre puede ser utilizado con fines cuantitativos.

En todos los casos se debe considerar previamente el uso de jeringas apropiadas. El material de la aguja es acero inoxidable, al igual que el émbolo, mientras que el cuerpo de la jeringa es de vidrio borosilicatado. Un criterio útil en la selección de jeringas, consiste en utilizar jeringas cuyo volumen total sea al menos dos veces mayor que el volumen a ser inyectado. En todos los casos y aplicaciones, la jeringa y sus partes deben ser cuidadosamente limpiadas y enjuagadas con solventes apropiados entre inyecciones.

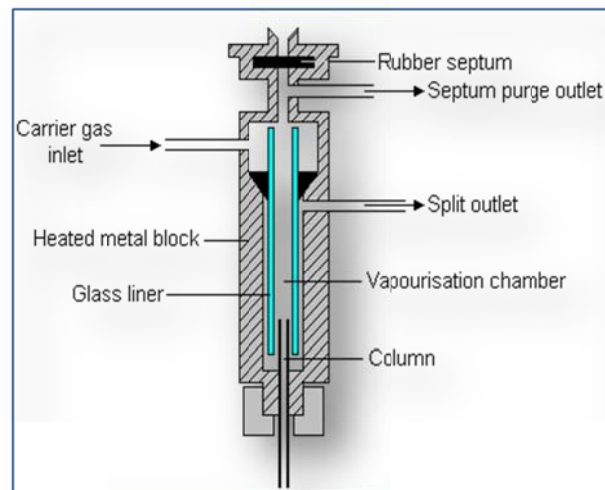


Fig. 2.9: Puerto de inyección

a) Modalidad split

Características

- La muestra se vaporiza en un inyector a alta temperatura
- La muestra vaporizada se divide (*split*) por lo que sólo una parte conocida de la muestra entra a la columna de separación
- La relación normal de split utilizada está entre 10:1 a 200:1
- El operador regula fácilmente la relación de split abriendo o cerrando una válvula y controlando los valores de flujo.

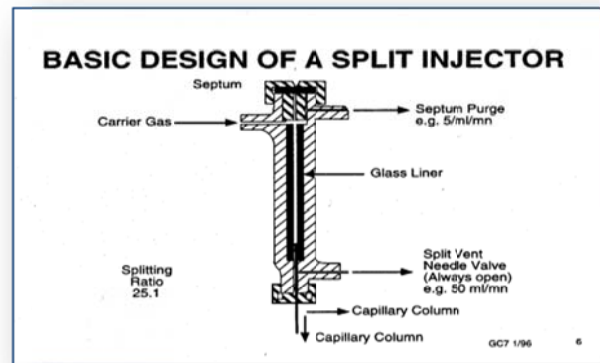


Fig. 2.10: Inyector Split

b) Modalidad splitless

Características y pasos a seguir:

- Se inserta en el inyector la jeringa y se aguarda alrededor de 5 segundos
- Se cierra la válvula de split (requiere purga de septa)
- Se inyectan entre 1 a 3 ml en la columna fría
- Se abre la válvula del split luego de 45 segundos para purgar el inyector (flujo 30-50 mL/min)
- Iniciar programa de temperatura de la columna (horno)

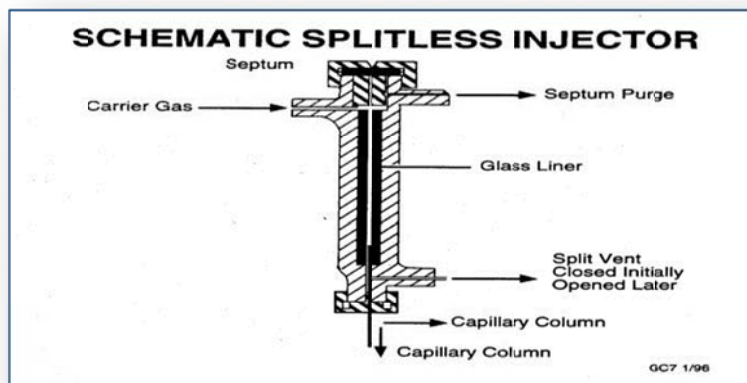


Fig. 2.11: Inyector splitless

3. Columna

La decisión más importante en la fijación de los parámetros para un análisis por cromatografía gaseosa, es la selección de la mejor columna o fase estacionaria. La otra decisión importante es la selección de la temperatura de la columna, pero se trata de una decisión menos crítica debido a la amplia posibilidad de programaciones que se pueden seleccionar y ensayar.²⁷

En la selección de una fase estacionaria se pueden seguir algunos o todos de los siguientes criterios:

- *Información previa acerca de la separación requerida* - Las referencias en la literatura y las notas de aplicación son fuente de este tipo de información. Si se encuentran otras columnas disponibles en el laboratorio, evaluar los resultados al utilizarlas.²⁷
- *Selectividad* – Determinar el tipo de interacción potencial entre el compuesto y la fase estacionaria (dispersión, dipolar, enlaces de hidrógeno). Si los

compuestos tienen diferentes dipolos o pueden formar puentes de hidrógeno, considerar una fase estacionaria selectiva con esas características.²

- *Polaridad* – Utilizar la fase estacionaria más no-polar que provea las separaciones requeridas.²⁷
- *Límites de temperatura* – Compuestos con altos punto de ebullición o pesos moleculares elevados requieren altas temperaturas de columna para evitar tiempos de retención extremadamente largos. Los límites de temperatura menores para las fases estacionarias polares, restringen su uso a compuestos con bajo o medio punto de ebullición (como aproximación a su volatilidad).²⁷
- *Actividad de cada compuesto* – Las columnas con fases estacionarias no polares generalmente son las más inertes. Con fases polares se pueden experimentar “tailings” importantes en los picos o adsorción.²⁷
- *Tiempo de análisis* – Algunas fases estacionarias dan separaciones satisfactorias en menos tiempo de corrida.²⁷
- *Capacidad* – Las fases estacionarias similares en polaridad a los compuestos a separar, tienen mayor capacidad para esos compuestos.²⁷
- *Sangrado* – En general, las fases estacionarias no polares tienen menos sangrado. Compuestos con elevados PE ó PM eluyen en zonas de alta temperatura donde el sangrado de la columna es más severo. Fases estacionarias no polares no sólo tienen menos sangrado, sino que además el máximo de sangrado ocurre a mayores temperaturas.²⁷
- *Detectores selectivos* – Se deben evitar las fases estacionarias que contengan especies o grupos funcionales que generen una fuerte respuesta a un detector selectivo (ej. cianopropil). En este caso usualmente ocurren derivas extremas de la línea de base y elevado ruido.²⁷
- *Versatilidad* – Para análisis múltiples, se pueden requerir diferentes fases estacionarias para obtener una óptima separación. En algunos casos, diferentes análisis pueden ser realizados con una sola fase estacionaria sacrificando calidad en la respuesta y obteniendo resultados aceptables. Esta práctica reduce el número de columnas necesarias, lo que reduce la complejidad de su manejo y el costo.²⁷

a) Horno de la columna

En el interior se sitúa la columna, donde se debe tener una buena regulación de la temperatura. Dentro del horno la columna se conecta en un extremo al puerto de inyección, y en otro el detector. La columna debe estar en el centro del horno sin tener contacto con las paredes.²⁷



Fig. 2.12: Horno del cromatógrafo de gases

b) Fase estacionaria

La fase estacionaria es la encargada de separar los componentes de la muestra. Esta puede ser un sólido o un líquido, dispuestos sobre un sólido que actúa como soporte (columna). El sólido de la fase estacionaria puede ser de aluminio, sílica gel, carbón o tierra de diatomeas, cuando la fase estacionaria es un sólido, la interacción que puede tener con la fase móvil se puede clasificar en: Adsorción, intercambio iónico y de filtración sobre geles porosos.²⁵

Las fases se pueden clasificar en:

- No polares: para separar sustancias pocas o nada polares. Las más utilizadas son las gomas de silicona OV-1, OV-101 o SE-30, para trabajar hasta 300°C donde se consiguen eficacias de columna extraordinarias.²⁶

- Con carácter ligeramente polar: utilización general, buena selectividad para mezclas mixtas. Sebecato de dietil (2etil hexilo), aceite de silicona, gomas de silicona.²⁶
- De polaridad media o alta: no aptos para hidrocarburos no aromáticos. Aceite de Ucon LB_550X, polifenil éter, Carbowax 1540.²⁵

c) Tipos de columnas

La elección de las columnas es lo más crítico, existen dos diferencias fundamentales que deben ser consideradas para la elección de las columnas: La cantidad de muestras que admiten (capacidad de carga). Valores de los flujos del gas portador.

La capacidad de carga se define como la cantidad de muestra que se puede inyectar sin pérdida apreciable de eficacia y está relacionado con la cantidad de fase estacionaria por unidad de longitud de la columna.^{26, 27, 28}

❖ *Columnas clásicas de relleno*^{27,28}

Constituidas por un tubo de metal o vidrio con relleno de soporte granular con la superficie recubierta por una película de fase estacionaria.

Longitud 1-10 m

Diámetro interno 2-4 mm hasta 5cm en escala preparativa

Tamaño de la partícula de relleno diez veces menor que le diámetro del tubo

Capacidad de carga grande

Relación de fases pequeñas

Permeabilidad baja

❖ *Columnas capilares rellenas*^{27,28}

Se distinguen de las columnas clásicas de relleno por el diámetro interno mide tubo, no excede un milímetro. Además, la relación entre los diámetros del tubo y de la partícula de relleno es del orden de tres a cinco veces. Esto hace que sea un relleno irregular y una permeabilidad del orden de diez veces superior.

Longitud de 10-50 cm
Diámetro interno de 1mm
Tamaño de partícula de relleno de 3 a 5 veces
Capacidad de carga pequeña
Relación de fases grande
Permeabilidad mayor que las clásicas

❖ ***Columnas capilares de capa porosa***^{27,28}

En este caso el soporte es depositado en le interior del tubo, después es recubierto por la fase estacionaria y la parte central del capilar permanece vacía

Longitud de 25-200 m
Diámetro interno de 0.1-0.5 mm
Tamaño de la partícula de relleno varía entre el de un soporte clásico y las partículas de carbono producidas por la pirólisis de una sustancia orgánica.
Permeabilidad valores máximos (al igual que las capilares abiertas)

❖ ***Columnas capilares abiertas***^{27,28}

También conocidas como columnas Golay, quien fue el primero en utilizarla (Golay,1958).

La fase estacionaria va depositada en la pared interior del tubo que actúa como soporte.

Longitud hasta 200 m, los más utilizados varían entre 50-100 m

Diámetro interno 0.1-0.5 mm

Capacidad de carga muy pequeña

Relación de fases es la más alta

Se debe considerar la solubilidad, cambios en la volatilidad y estabilidad de los solutos, cambios en el flujo y estabilidad de la fase estacionaria. La temperatura debe estar dentro de la T_{mi}/T_{max} de la columna.

Determinar la temperatura inicial y el tiempo basado en la mejor separación posible de los primeros picos. Repetir uno para los últimos picos para encontrar la mejor temperatura y tiempo. Experimentar con varias rampas para el resto de los componentes.

d) Factores que disminuyen la eficacia de una columna

- Longitud de la columna. Limita en cuanto a las velocidades lineales del gas portador, originando tiempos de análisis muy largos y sin mejorar la resolución.^{21, 28, 29}
- Diámetro de la columna. Mas importante en columnas capilares abiertas, por la resistencia que opone la fase móvil a la transferencias de masas.^{21, 28, 29}
- Tamaño de la partícula de relleno²¹
- Naturaleza de las fases. Fase estacionaria no afecta, Gas portador: viscosidad y valores de coeficiente de difusión en la fase móvil.²¹
- Cantidad de fase estacionaria. A menor cantidad mayor eficacia.²¹
- Temperatura de la columna. Al aumentar esta disminuye la eficacia al afectara directamente el coeficiente de reparto.²¹
- Velocidad del gas portador. Una velocidad elevada es la óptima.²¹
- Cantidad de muestra inyectada.²¹



A



B

Fig. 2.13: Columna A) empacotada B) capilar

4. Programación de temperatura

La columna se encuentra termostata de modo de obtener una buena separación en un tiempo razonable. Por lo tanto se hace necesario mantener la columna en un amplio rango de temperaturas diferentes, desde temperatura ambiente hasta 360 °C. El control de la temperatura de la columna es una de las formas más sencillas y más efectivas de influenciar la separación de los componentes. La columna se fija entre un inyector mantenido a una temperatura de inyección, y un detector mantenido a una temperatura también predeterminada. Por lo tanto, se debe definir la temperatura a la que cada uno de los componentes opera.²⁷

a) *Temperatura del inyector*

La temperatura del inyector debe ser suficientemente alta como para vaporizar la muestra en forma rápida, pero lo suficientemente baja como evitar su descomposición térmica o arreglos químicos.³²

La determinación de los valores óptimos se logra mediante práctica y experiencia.

b) *Temperatura de la columna*

La temperatura de la columna debe ser lo suficientemente alta como para asegurar que los componentes de la muestra atraviesen la columna a una velocidad razonable. Sin embargo, no puede ser mayor que el punto de ebullición de la muestra; de hecho es preferible que la temperatura de la columna se encuentre por debajo del punto de ebullición. Se debe tener en cuenta de que la temperatura de la columna debe operar a una temperatura a la que la muestra está en estado *vapor*, pero no debe estar en estado de *gas*. ES decir que en cromatografía gaseosa, la temperatura debe ser mantenida por encima del “punto de rocío” de la muestra, pero no por encima de su punto de ebullición.³²

Las técnicas utilizadas implican el uso de sistemas isotermos (donde la temperatura de la columna se mantiene constante) o de temperatura programada (PTGC), donde la columna se somete a un incremento lineal de la temperatura con el tiempo.

c) Temperatura del detector

La temperatura del detector depende fundamentalmente del tipo de detector empleado. Sin embargo, como regla general la temperatura del detector y la de su conexión a la salida de la columna, deben ser suficientemente altas como para evitar la condensación de la muestra. Si la temperatura es muy baja y ocurre condensación, se producirá ensanchamiento de los picos o la ausencia total de los mismos.^{30, 31}

En el caso del detector de ionización de llama, una temperatura mínima razonable es de 250 °C.

5. DETECTORES²⁵⁻³¹

Los detectores son dispositivos que indican y miden los solutos en la corriente del gas acarreador, convirtiendo una señal no medible en una señal elaborable de una propiedad física. Esta señal es elaborada por una comparación entre el gas acarreador puro (blanco) y el mismo gas llevado cada uno de los componentes previamente separados en la columna esto es traducido en una señal eléctrica que es amplificada y registrada al momento de salir de la columna.

Un buen detector es altamente sensible (sensibilidad) tiene una respuesta lineal (lineabilidad) sobre un amplio rango de concentración y es relativamente insensible a variaciones de flujo y temperatura (rango dinámico lineal).

Pueden ser clasificados por:

- Grado de selectividad: universales que responden a la mayoría de solutos, específicos-selectivos con respuesta a un grupo particular de sustancias.
- Recuperación de la muestra: dependientes del flujo de la masa (cantidad de soluto independientemente de la cantidad del gas portador), dependientes de la concentración (cantidad de soluto por unidad de volumen de gas portador)
- Proceso de detección: ionización, óptico-espectroscópico, electroquímico.

a) Detector de Conductividad Térmica (TCD termal conductivity detector)

Consiste de dos celdas metálicas idénticas, cada una conteniendo un filamento de alambre de tungsteno o de tungsteno con lámina de oro. El efluente fluye a través de una celda y el gas portador (He o H₂) fluye a través de la otra. En un lado de la muestra el gas fluye por el filamento mientras que en el lado de referencia el gas puede pasar sobre el alambre del filamento y difundir a través de él. Los filamentos son calentados por una corriente eléctrica. La temperatura del elemento censor depende de la conductividad térmica del gas que fluye alrededor. Cambios en conductividad térmica, como cuando las moléculas orgánicas desplazan un poco al gas portador, provocan un incremento en la temperatura del elemento el cual está siendo monitoreado como un cambio en la resistencia.

Dos pares del TCD son utilizados en cromatógrafos de gases, un par localizado en la salida de la columna para detectar los componentes separados mientras van saliendo, el otro par localizados antes del inyector o en una columna de referencia separando las resistencias de los dos pares y están acomodados en un circuito de puente.

Para un máximo de sensibilidad, la temperatura del filamento es incrementada, la temperatura y la velocidad del flujo son disminuidas y se escoge un gas con mayor conductividad térmica (la mayoría de los gases orgánicos tienen calores de conductividad bajos).

Este es un método no destructivo dependiente de concentración, con selectividad universal, con un límite de detección de ~400 pg/ml de gas portador. Su modo de detección es debido al cambio de resistencia del cable basado en la termoconductividad del gas cuando fluye a través de la columna.

b) Detector de Ionización de Flama (FID flame ionization detector)

El FID consiste de una flama hidrogeno –aire y una placa colectora. Las muestras que salen de la columna pasa a través de la flama, la cual rompe las moléculas orgánicas y produce iones. Los iones son colectados en unelectrodo parcial y

produce una señal eléctrica. Es extremadamente sensible a un amplio rango dinámico. La única desventaja es que destruye la muestra.

La muestra debe ser un combustible, esta entra en la base del detector, se mezcla con el hidrogeno y entra en la flama. Hay compuestos con poca o sin respuesta la FID, compuesto como el NH_3 , CO , CO_2 , O_2 , H_2O , N_2 , etc. La respuesta está basada en el número de carbonos y otros elementos tales como los halógenos y el oxígeno presentes que reducen la combustión.

Este es un método destructivo dependiente del flujo de masa, con selectividad para compuestos orgánicos. Su modo de detección es debido a la producción de iones en una flama resultando en una corriente que puede ser medida.

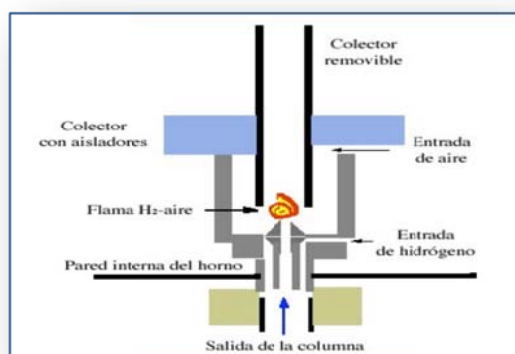


Fig. 2.14: Detector FID

c) Detector Fotométrico de Flama (FPD flame photometric detector)

Es uno de los más usados en los métodos selectivos de cromatografía de gases. El FPD consiste en una flama reductora que produce especies quimioluminiscientes. Estas especies emiten una luz característica que es óptimamente filtrada por la longitud de onda deseada, la cual determina que componentes son los detectados. La luz filtrada es medida por un fotomultiplicador (PMT) y transducida a una señal. Se puede agregar un segundo fotomultiplicador, el cual permite una detección simultánea de una segunda señal.

Los filtros para FPD pueden ser seleccionados para diferentes componentes, pero los más comunes son para la detección de sulfurados y fosforados en mezclas

complejas. La selectividad de FPD clásicos (como una porción por peso de carbono) es 10^5 para sulfurados y 10^6 para fosforados

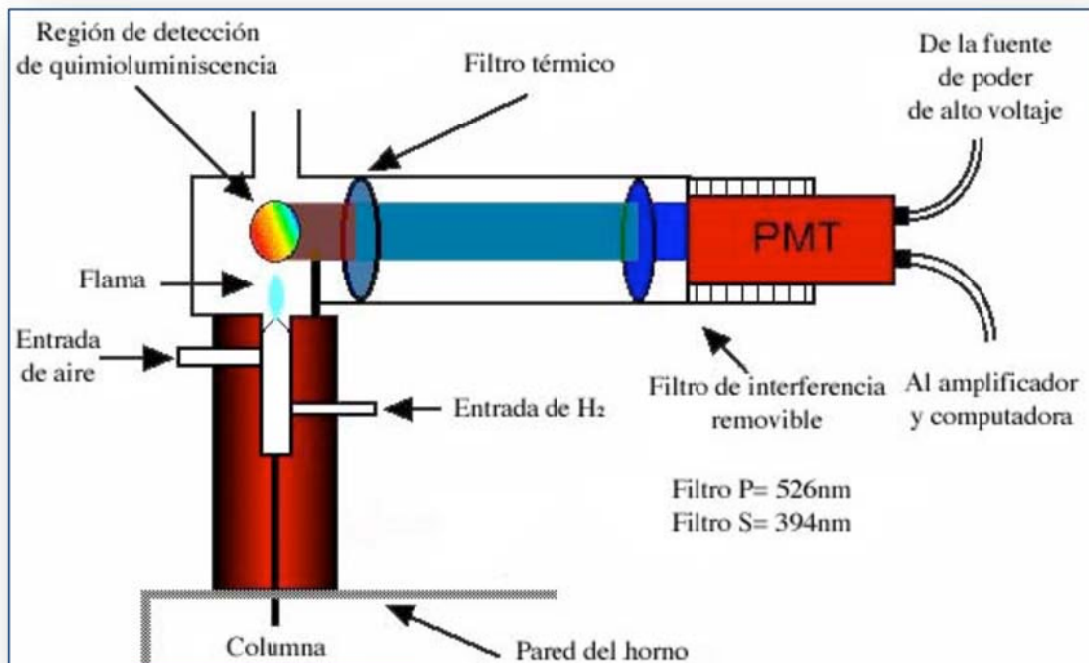


Fig.2.15: Detector FPD

d) Detector de Captura de Electrones (ECD electrón capture detector)

Es altamente sensible a compuestos halógenos y por lo tanto muy útil en la detección de pesticidas. Da un poco de respuesta a hidrocarburos y a otros carbonilos conjugados. Para este tipo de cromatografía la muestra debe contener una fase gaseosa electrófora. Este es un sistema donde se detectan partículas β por absorción de especies que contienen halógenos, nitrilos, nitratos, organometales y dobles enlaces conjugados. Las partículas β son emitidas por una fuente de ^{63}Ni , los electróforos la absorben reduciendo la corriente, siendo esta la base de la respuesta.

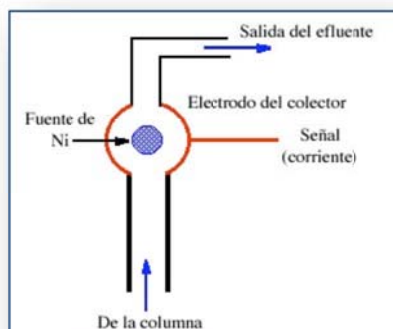


Fig. 2.16: Detector ECD

a) Detector de Fotoionización (PID photoionizacion GC detector)

Este tipo de detector es muy selectivo para los compuestos con hidrocarburos aromáticos o con heteroátomos, los cuales tienen potenciales de ionización. Utiliza luz ultravioleta para ionizar un analito, la longitud de onda oscila entre 106-150 nm. Los iones producidos son colectados por electrodos siendo la corriente generada una medida de la concentración del analito.

Este es un método no destructivo dependiente de concentración, con selectividad para compuestos alifáticos, aromáticos, heterocíclicos, organosulfurados y algunos organometalicos, cetonas, esterés, aldehídos y aminas. Su modo de detección es debido a los potenciales de ionización de los compuestos analizados.

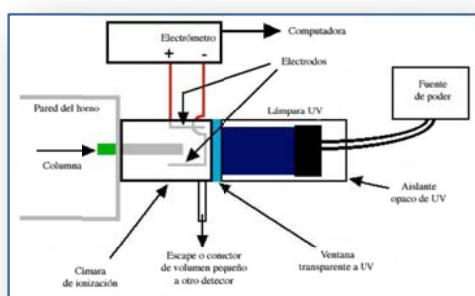


Fig. 2.17: Detector PID

a) ESPECTROMETRO DE MASAS

El espectrómetro de masas es el detector más poderoso utilizado tanto en la cromatografía de gases como en la cromatografía líquida para llevar a cabo un análisis tanto cualitativo como cuantitativo de los analitos. En la espectrometría de masas, las moléculas gaseosas son ionizadas, son aceleradas en un campo eléctrico y por último son separadas en función de la masa.²¹

El proceso natural tiene suficiente energía como para romper las moléculas en varios trozos y al gráfico que representa la abundancia isotópica relativa de cada trozo se le denomina espectro de masas.²¹

En el eje X de este espectro de masas se representa la relación m/z donde m es la masa de un ion (en unidades de masa atómica-uma-) y z es la carga del ion. Como en muchos casos la carga del ion equivale a la unidad la relación m/z se reduce a la masa del ion. Al trozo de igual masa a la de la molécula original (M_r) se le denomina ion molecular.²¹

El espectrómetro de masas se puede separar en 4 partes: interface, fuente de ionización, zona de separación y detector.

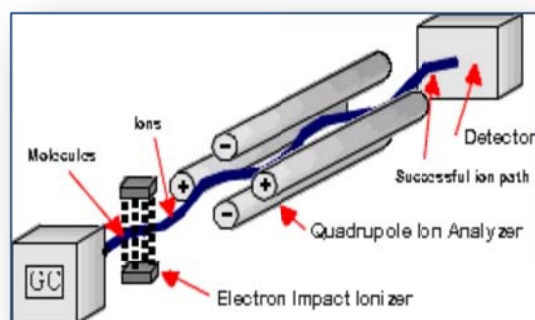


Fig. 2.18: Interior de un MS

La interfaz une la columna capilar y la fuente de ionización. Por una parte, la presión de la columna es muy alta y en la fuente de ionización lo que es alto es el

vacío. En esas condiciones las funciones de la interface son las siguientes: quitar las moléculas de gas transportador e introducir las moléculas de analito en el espectrómetro de masas.

Las moléculas de analito que llegan a la fuente de ionización son moléculas bombardeadas con electrones de alta energía que provienen del filamento (ionización por medio del choque de electrones). Normalmente una energía controlada de los electrones de 70 eV suele ser suficiente para provocar la ionización ($M + e^-$, $M^+ + 2 e^-$) y garantizar la rotura de la molécula iónica. Las partes obtenidas son llevadas al espectrómetro de masas para medir su espectro.²¹

Tipos de ionización:³²

- **Impacto electrónico (EI)**³²

Es la ionización más utilizada en GC/MS donde se da una fragmentación extensiva “huella digital” de la molécula, con el propósito de identificación.

El valor m/z del ion M^+ ofrece información sobre el peso molecular del compuesto para ser identificado. Normalmente los iones positivos son analizados.²⁶

- **Ionización Química (CI)**³²

Se da por reacción de ion molecular, es una ionización más baja, por lo tanto es un proceso más suave.

Nos da una información estructural limitada.

- **Ionización Química Negativa (CNI)**³²

Se da por interacción electrón-molécula (e^- de baja energía) para formar iones negativos (proceso captura de e^-).

Tiene una sensibilidad alta para este tipo de compuestos. Es una fragmentación no tan alta y nos da una limitada información estructural.

Monitoreo de los Iones en MS³³

Existen dos modos SCAN Y SIM

- SCAM

Los iones moleculares con rango de masas son monitoreados secuencialmente, este modo nos da el espectro de masas, la cual es importante para la identificación.³⁴

- SIM

Solo unos pocos iones moleculares son monitoreados. Este modo tiene mejor sensibilidad

6. Cromatografía de Gases y Espectrometría de Gases (GC-MS)



Fig. 2.19: GC-MS

Durante los últimos veinte años la MS y GC han demostrado repetidamente, en gran número de laboratorios en todo el mundo, su versatilidad como métodos analíticos para la determinación estructural y separación de compuestos orgánicos. Ambas técnicas han alcanzado últimamente un alto grado de desarrollo en sus diversas facetas prácticas, habiéndose convertido respectivamente e independiente de dos métodos analíticos en los que se conjuntan una gran rapidez, sensibilidad y poder resolutivo.²¹

Aunque en la práctica en 1957 la cromatografía de gases y la espectrometría de masa avanzaron por caminos diferentes pero paralelos en el campo del análisis orgánico, gracias al gran potencial demostrado por los primeros intentos de

combinación y su rápido desarrollo, en la actualidad la combinación directa cromatografía de gases- espectrometría de masas se reconoce como uno de los sistemas más eficaces a disposición del químico analista para el estudio e identificación de mezclas complejas de productos orgánicos.²¹

Conectando la salida de un cromatógrafo de gases a la cámara de ionización de un espectrómetro de masas se puede obtener información estructural (espectro de masa) para cada uno de los componentes de la mezcla original, previamente inyectada en el cromatógrafo, a medida que estos son eluidos en serie de la columna cromatográfica. De esta forma las limitaciones inherentes de la cromatografía de gases quedan considerablemente reducidas en el análisis cualitativo. Dichas limitaciones surgen del hecho de que mientras la cromatografía de gases pueda separar los componentes individuales de una mezcla con un alto grado de poder resolutivo, no puede dar, en sentido riguroso más que información preliminar sobre su estructura. Hay que señalar como esencial que cualquier columna cromatográfica no es un instrumento analítico, sino un medio de separación física.²¹

Asimismo, desconectando ciertos detectores específicos (por ejemplo captura de electrones, fósforo, etc.) los detectores cromatográficos solamente responden en general a la cantidad de la muestra eluida por la columna, por ello la utilización de los datos basados en el tiempo de retención absoluto o relativo puede resultar un método adecuado para la identificación tentativa de ciertos compuestos o mezclas relativamente simples o para las cuales se dispone de los correspondientes patrones. Sin embargo cuando esta metodología se intenta llevar a extremos, como el análisis de mezclas de productos naturales de extrema complejidad, los resultados así obtenidos carecen de la precisión cualitativa, sobre todo en los casos que se requiere una programación de la temperatura de la cromatografía de gases y se carece de compuestos patrón. A este respecto, una de las áreas más activas de la combinación cromatografía de gases-espectrometría de masas es en conclusión la identificación de compuestos nuevos o no sospechados previamente.²¹

a) Muestras para GC-MS

Ejemplo:

- Pesticidas en aguas, frutos, vegetales, etc.
- Solventes orgánicos, en materiales de embalaje
- Drogas en orina sangre
- Alcoholes en sangre
- Ácidos grasos
- Aceites esenciales.

b) Sistemas de Muestreo GC-MS

- **Inyección líquida:** muchas muestras para GC-MS son introducidas como líquidas, y en este tipo de técnica se usan microjeringas.

La muestra es introducida directamente en la fuente de iones del MS pasando por el GC.³⁰

- **Head Space (HS) “espacio de cabeza”**

Supongamos que en un recipiente cerrado hay una muestra (tanto sólida como líquida) con compuestos volátiles y un lugar entre la muestra y el recipiente (espacio de cabeza).³⁰

Si se coge a través de una jeringa de gases una cantidad pequeña de la muestra de ese “espacio de cabeza” y se inyecta de forma directa en el cromatógrafo de gases se habla de la técnica de espacio de cabeza.³¹

Es una técnica rápida, sencilla, automatizable y directa pero solo viable en compuestos volátiles y semivolátiles conteniendo matrices sólidas o líquidas.³⁰

Por ejemplo: solventes residuales en empaquetamiento.

- **Pirólisis:**

Las moléculas muy grandes especialmente los polímeros, no se pueden analizar por cromatografía de gases porque la volatilidad de estos compuestos es pequeña. En la pirólisis, estas sustancias que no son volatilizables son transformadas en sustancias más pequeñas que si pueden ser analizadas por cromatografía de gases utilizando para

ello una energía en forma de calor como “ribbon type”, “punto curie” o “pirolizantes laser”.³⁰

Por ejemplo: polímeros

- **Purga y Trampa:**

Si se purga una fase gas en equilibrio junto con la muestra (tanto líquida como sólida), tras introducir continuamente una fase gaseosa limpia o sin analitos se rompería el equilibrio gas-líquido o gas-sólido.³⁰

Gracias a la ruptura de este equilibrio se conduciría el analito de modo más cuantitativo que el caso anterior.

- **Derivatización de la Muestra:**

En el caso de moléculas que no son vaporizables es necesario crear derivados que si lo sean.

En el proceso de derivatización tiene lugar un cambio químico en los grupos funcionales de la molécula y como consecuencia de ello se mejoran tanto las características de detención como de separación de las moléculas.³⁰

Modifica los componentes para dar más volatilidad, aumentar estabilidad térmica, etc.

c) **Cuantificación GC-MS**

Determinación de las concentraciones individuales de los compuestos que son separados.

En GC el objetivo es alcanzar la separación completa de los compuestos, para que aisa cada compuesto detectado sea puro, y su concentración pueda ser determinada exactamente.³⁰

Métodos principales para cuantificación:

- **Método de Normalización (porcentaje de área)³⁰**

Determina la composición relativa de una muestra

Contenido del compuesto en la muestra (C):

$$C_i = A_i/A_T \times 100\%$$

A_i = Área del pico del compuesto en el cromatograma

A_T = Área total de los picos en el cromatograma

Precaución:

Respuesta del detector es asumido a ser el mismo para compuestos diferentes.

Compuestos de la muestra inyectada son asumidos de ser todos detectados y producir picos.

- **Método de Normalización Área Corregida:³⁰**

Determina la composición relativa de la muestra

Ajuste (corrección) es hecha para considerar la diferencia de la respuesta del detector para compuestos diferentes

Muestras conteniendo compuestos con concentraciones conocidas son analizados primero.

- **Método de Curva de Calibración Absoluta (patrón externo)³¹**

Determina las concentraciones absolutas de los compuestos de la muestra

Incluye:

- Medición de mixtura de patrón con concentración conocida.
- Generación de curva de calibración de patrón externo (que exhibe relación entre concentración absoluta/cantidad del compuesto y su altura/área del pico).
- Medición de la muestra con concentraciones desconocidas de sus compuestos.
- Cálculo de las concentraciones de los compuestos a partir de sus alturas/áreas del pico.

- **Método Patrón Interno**³⁰

Compuesto patrón adicional es añadida al patrón y muestra (The Internal Standard, IS)

Determina concentraciones de los compuestos de la muestra usando la concentración del IS y su respuesta relativa al compuesto de interés.



CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. CAMPO DE INVESTIGACIÓN

3.1.1. Unidades de Estudio

El trabajo de investigación se llevó a cabo con 3 muestras (A, B y C) desecadas de la planta *Mentha piperita L.*, adquiridas de Puquio-Ayacucho-Perú.

3.1.2. Ámbito Geográfico y Tiempo

Este trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Química Orgánica (pabellón F-303) y Laboratorio de Control de Calidad (pabellón H-204), de la Universidad Católica de Santa María de la ciudad de Arequipa-Perú, durante los meses de abril a diciembre del año 2012.

3.2. MATERIALES

A. Materiales de Laboratorio

- Pipetas graduadas de 0.5, 1 ml.
- Pipetas volumétricas de 2, 5 y 10 ml.
- Micropipetas automáticas de 10-50-200-1000 ul.
- Bureta graduada de 10, 100 ml.
- Fiolas de 10, 25 ml.
- Vasos de precipitado de 200 y 250 ml.
- Pera de decantación de 125 y 250 ml.
- Erlenmeyer de 100 y 250 ml.
- Embudo de vidrio.
- Probeta graduada de 100 ml.
- Balón de 100, 500 ml y 1 L.
- Trampa Clevenger.
- Refrigerante.
- Adaptadores esmerilados de vidrio.
- Cuba para Baño María.

- Agitador magnético.
- Papel filtro.
- Pipetas Pasteur.
- Frascos de vidrio ámbar con tapa rosca.
- Cuba para CCF.
- Placas de sílica gel.
- Capilares.
- Viales para GC-MS de 1.5 ml.

B. Reactivo

- Etanol 96% (Diproquim)
- Agua destilada.
- Diclorometano 100 % p.a. (Diproquim)
- Diclorometano grado GC (Merck)
- Sulfato de sodio Anhidro p.a. (Merck)
- Dicromato de potasio p.a. (Merck)
- Ácido sulfúrico p.a. (Merck)
- Hidróxido de Sodio p.a. (Diproquim)
- Anhídrido Acético p.a. (Merck)
- Acetato de sodio p.a. (Merck)
- Carbonato de sodio p.a. (Merck)
- Hielo seco (Praxair).
- Hidróxido de potasio p.a. (Merck)
- Tolueno p.a. (Merck)
- Cloroformo p.a. (Merck)
- Anisaldehido p.a. (Merck)
- Ácido acético glacial p.a. (Merck)
- 2,4 Dinitrofenilhidrazina p.a. (Merck)

C. Estándares

- l-Mentol (Merck)
- l-Mentona (síntesis y purificación propia)
- l-Acetato de mentilo (síntesis y purificación propia)

D. EQUIPOS

- Equipo de Destilación con Trampa Clevenger.
- Rota vapor (Buchi), modelo R-114.
- Bomba de vacío Cenco megavac
- Stirrer Hot Plate VELP, modelo ARE
- Refractómetro Digital Abbe (Optic Ivymen System), modelo WYA-S
- Polarímetro automático, modelo Polax-2L.
- Balanza Analítica (Ohaus), modelo Pioneer.
- Vortex homogenizador Barnstead, modelo M37610-33.
- Cromatógrafo de Gases con Detector de Masas GC/MS-QP 2010 Ultra Shimadzu, con el siguiente equipamiento:
 - Auto inyector Shimadzu AOC-201
 - Columna RTX-5MS, Thickness 0.25 um, Length 30m, diameter 0.25 mm.

3.3. MÉTODOS

3.3.1. Obtención del Aceite Esencial de *Mentha piperita* L.

a. **Método:** Hidrodestilación Clevenger.

b. **Procedimiento:**

- El material vegetal (*Mentha piperita* L.), previamente desecada, se debe trozar momentos antes de la hidrodestilación.
- Se coloca una cantidad adecuada de *Mentha piperita* L. (aprox. 100 g), en el balón de 1L de capacidad, del equipo de Hidrodestilación Clevenger.
- Se añade una cantidad adecuada de agua destilada (aprox. 400 a 500 ml), pero sin sobrepasar el cuello del balón para evitar proyecciones al momento de la hidrodestilación.
- Se arma el equipo de Hidrodestilación Clevenger, se coloca en una cuba de Baño María de aceite, se forra con papel aluminio todas las partes del equipo a excepción del refrigerante, a fin de dar calor al sistema.
- Se debe controlar la temperatura del sistema que no debe sobrepasar los 120 °C, para evitar evaporación del aceite esencial y olores empíreumáticos.
- El proceso deber durar entre 2 a 3 horas.
- En este proceso la Trampa Clevenger desempeña un rol importante, ya que en esta se ira juntando el aceite esencial, que por densidad en el caso de la

Mentha piperita L., se situará en la parte superior, y la parte acuosa en la inferior.

- Luego se abre la llave de la trampa, antes que se llene en su totalidad de aceite esencial y agua.
- El agua del sistema caerá nuevamente en el balón, mientras que el aceite quedara colectado en la trampa.
- Transcurrido el tiempo del proceso, se retira la trampa Clevenger que contiene el aceite con un poco de agua, se deja en reposo aproximadamente 24 horas.
- Se lleva a pera de separación, luego se añade diclorometano, se agita cuidadosamente de 2 a 3 veces y se deja en reposo.
- Se recupera la fase orgánica en vaso de precipitado, luego se añade sulfato de sodio anhidro, dejando reposar de 10 a 15 minutos.
- Se filtra con papel filtro por gravedad, se lleva a rota vapor, hasta completar evaporación del diclorometano.
- El aceite esencial obtenido, se debe guardar en un frasco ámbar cerrado herméticamente y bajo refrigeración a 4°C.



Fig.3.1: Hidrodestilación Clevenger

IMPORTANTE:

- El reposo del aceite esencial en la trampa clevenger debe ser de 24 horas para facilitar la separación completa de la parte acuosa, lo que se ve reflejado positivamente en el rendimiento final del aceite esencial obtenido.
- El éxito de la eliminación del diclorometano del aceite esencial, en el rota vapor, consta de ayudar al sistema con un Baño María a 40 °C para evaporar el diclorometano, así como que por el refrigerante del rota vapor circule agua helada para mejorar la condensación y recuperación del solvente.



Fig. 3.2: AE. de *Mentha piperita* L. en reposo

c. Expresión de Resultados:

La cantidad de aceite esencial obtenido se expresa como porcentaje de rendimiento (%R), de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% R = \frac{\text{Peso del Aceite esencial Obtenido}}{\text{Peso del Material de Partida}} \quad (\text{Ecuación 3.1})$$

3.3.2. Determinación de las Características Organolépticas del Aceite Esencial de *Mentha piperita* L.

Dentro de todos los niveles de la cadena productiva de un aceite esencial, el primer control que se realiza es el de las características organolépticas. Esta prueba se realiza para saber si el AE. presenta adulteración.

Dentro de estas características las más resaltantes son olor, sabor y color.⁵

3.3.3 Determinación de las Características Fisicoquímicas del Aceite Esencial de *Mentha piperita* L.

A. Determinación del Poder Rotatorio

- **Método:** Polarimétrico (polarimetría)
- **Fundamento:** Se basa en la medición de la rotación del plano de polarización de la luz, cuando esta atraviesa cierto espesor de aceite esencial en condiciones determinadas.³⁴
- **Procedimiento:**
 - Se pesa aproximadamente 0.02 g/ml en un matraz y se disuelve con etanol de 96%.
 - Se coloca en tubo de 100mm. La solución y se coloca en el polarímetro, en el espacio correspondiente entre el polarizador y el analizador.
 - Se debe evitar burbujas dentro del tubo, que pueda interferir con el análisis.
 - Se ajusta el analizador, hasta que ambas mitades en el campo de visión tengan igual intensidad de luz.
 - Leer directamente la desviación óptica reportada en grados, y la dirección de la desviación (+) dextrógiras y (-) levógiras.
- **Expresión de los Resultados:**

La desviación polarimétrica a 20 °C se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\alpha_{D}^{20^{\circ}\text{C}} = \frac{A \times V}{L \times P} \quad (\text{Ecuación 3.2})$$

Donde:

- A = el valor del ángulo de rotación, expresado en grados.
- L = la longitud del tubo, expresado en decímetros.
- V = volumen de la solución, en mililitros.
- P = peso de la sustancia disuelta, en gramos.

B. Determinación de la Densidad

- **Método:** Gravimétrico
- **Fundamento:** Se fundamenta en la relación entre el peso (masa) de un volumen dado de aceite esencial y su volumen, determinados a 20 °C.³⁴
- **Procedimiento:**
 - Una pipeta de 1ml se llenó hasta su línea de enrase con agua destilada a la que previamente se le midió la temperatura, luego se pesó el agua contenida en la pipeta por 20 veces con la finalidad de determinar el verdadero volumen que aloja la pipeta.
 - Luego con la muestra de aceite esencial, que estaba a la misma temperatura del agua al momento de la prueba, se realizó el mismo procedimiento por 3 veces.

- **Expresión de Resultados:**

Se debe calcular primero el volumen real de la pipeta (V_{lR}) y luego la densidad del aceite (ρ A.E.), de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$V_{lR} = \frac{H_{2O}}{\rho_{H_{2O}}} \quad (\text{Ecuación 3.3})$$

$$\rho \text{ A.E.} = \frac{A.E.}{V_{lR}} \quad (\text{Ecuación 3.4})$$

Donde:

- H_{2O} = promedio de las pesadas con agua.
- A.E. = promedio de las pesadas con aceite.
- $\rho_{H_{2O}}$ = Densidad del agua a la temperatura del ensayo

C. Determinación del Índice de Refracción

- **Método:** Refractométrico (Refractómetro ABBE)
- **Fundamento:** Consiste en la medición del ángulo de refracción del aceite esencial mantenido en condiciones de transparencia e isotropismo siendo la longitud de onda de 589.3 nm, que corresponde a la línea D del sodio y siendo la temperatura de 20 °C.³⁴
- **Procedimiento:**
 - Previamente se debe calibrar el refractómetro con agua destilada, que corresponde a un índice de refracción de 1.33 a 20 °C.
 - Limpiar los prismas del refractómetro con alcohol.
 - Colocar unas gotas de aceite esencial y cerrar los prismas adecuadamente.
 - Se ajustan las perillas de dispersión y el control para alinear la frontera entre la línea clara y oscura con el centro de la X.
 - Se toma directamente la lectura el índice de refracción y se tiene en cuenta la temperatura.
- **Expresión de Resultados:**

El índice de refracción a 20°C (n_d^{20}) se calcula según la siguiente ecuación:

$$n_d^{t'} = n_d^{20} + a (t' - 20 \text{ °C}) \quad (\text{Ecuación 3.5})$$

Donde:

- $n_d^{t'}$ = Índice de refracción a la temperatura del ensayo.
- a = factor de corrección. En general $a = 0.0004$.
- t' = temperatura del ensayo.

D. Determinación de Índice de Acidez

- **Método:** Titulación Volumétrica
- **Fundamento:** Se basa en la neutralización de los ácidos libres por una solución alcohólica de hidróxido de potasio.³⁴

- **Procedimiento:**

- Se pesa 0.1 g de aceite esencial., dentro de un matraz Erlenmeyer.
- Agregar 10 ml de etanol, y 5 gotas de rojo de fenol.
- Neutralizar la solución obtenida con hidróxido de potasio 0.1 N hasta la aparición de una coloración que persista por algunos segundos.

- **Expresión de resultados:**

El índice de acidez se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de Acidez} = \frac{56.1 V \times N}{P} \quad (\text{Ecuación 3.6})$$

Donde:

- V = volumen en mililitros de hidróxido de potasio utilizado.
- N = normalidad verdadera del hidróxido de potasio.
- P = peso en gramos del aceite esencial.

3.3.4. Síntesis y Purificación de Estándares de l-Mentona y l-Acetato de Mentilo

Entendiéndose la síntesis orgánica como la construcción planificada de moléculas orgánicas mediante reacciones químicas. Y la purificación de sustancias orgánicas como la depuración de impurezas se procedió:⁹

- A partir del Estándar de l-Mentol $C_{10} H_{20} O$, $M = 156.26$ g/mol, Ensayo: $\geq 98\%$, Densidad: 0.890, al que se le evaluó su poder rotatorio como característica fisicoquímica importante para indicar su identidad y pureza.

Se procedió a sintetizar y purificar los estándares l-Mentona y l-Acetato de Mentilo.

A. Síntesis y Purificación de l-Mentona.³⁵

- **Reactivos:**

- Estándar de l-Mentol.
- Dicromato de Potasio.
- Ácido Sulfúrico cc.

- Agua destilada.
- Diclorometano p.a.
- Hidróxido de sodio al 5%
- Sulfato de Sodio anhidro

- **Procedimiento:**

- **Síntesis:**

- Se pesa 12.0 g de dicromato de potasio, 10 g de ácido sulfúrico.
- Se lleva a un balón de 500 ml, se añadió 60 ml de agua destilada, y se añadió en 4 porciones el l-mentol previamente pulverizado.
- Se forma una masa negra la cual tiene que estar bajo agitación (stirring con agitador magnético, a temperatura ambiente)
- La temperatura se eleva a 55 °C aproximadamente al empezar la reacción, y cuando esta se haya completada la temperatura desciende.
- El aceite se mezcla con igual volumen de diclorometano y es llevado a pera de separación, se agita suavemente de dos a tres veces y se deja en reposo alrededor de 15 minutos.
- Se desecha la fase acuosa y se recupera la fase orgánica, la que es lavada con hidróxido de sodio al 5%.
- Lavada la fase orgánica, se recupera y se seca con sulfato de sodio anhidro, se filtra y se lleva a rota vapor hasta eliminar el solvente.
- Se debe obtener un líquido oleoso, guardar en frasco de vidrio ámbar hermético hasta su purificación.

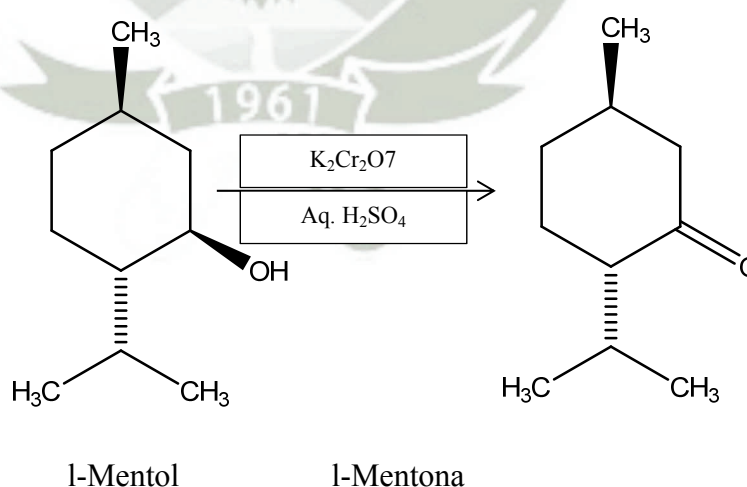


Fig.3.3: Síntesis de l-Mentona

➤ **Purificación:**

- El proceso de purificación se llevó a cabo mediante destilación al vacío, con una bomba de vacío de 2mmHg de presión, conectada a equipo de destilación de vacío.
- En medio de esta conexión se conectó una trampa de vacío con hielo seco, a fin de bajar la temperatura y mejorar la condensación.
- Se calculó con un nomograma la temperatura aproximada en la que empezaría la destilación, sabiendo que el punto de ebullición de la l-Mentona es de 207 °C a 1 atmósfera de presión.
- La colección de la l-Mentona se dio en tres porciones (cabeza, cuerpo y cola), considerando la porción del cuerpo como la más pura.
- Se guardó en frasco de vidrio ámbar sellado herméticamente hasta su análisis en el GC-MS.

B. Síntesis de l-Acetato de Mentilo.³⁵

• **Reactivos:**

- Estándar de Mentol.
- Anhídrido acético.
- Acetato de sodio anhidro
- Agua destilada
- Carbonato de sodio al 25%
- Diclorometano
- Sulfato de Sodio anhidro.

• **Procedimiento:**

➤ **Síntesis:**

- Se pesa 15.62 g de l-mentol, 20.42g de anhídrido acético y 2g de acetato de sodio anhidro.
- Se lleva a balón de 100ml, conectado a reflujo, en agitación constante (hot plate stirring), en Baño María de aceite, controlando que la temperatura no exceda los 130°C por un periodo de 2 horas.
- Se deja enfriar, luego se lleva a pera de separación y se lava con agua destilada tibia (aproximadamente 25 ml).
- Se elimina la fase acuosa.

- Se lava nuevamente con carbonato de sodio al 25 % (tener cuidado de proyecciones), luego se le añade diclorometano.
- Se recupera la fase orgánica, se seca con sulfato de sodio anhidro, posteriormente filtrar y llevar a rota vapor hasta eliminar solvente.
- El producto es guardado en frasco de vidrio ámbar sellado herméticamente hasta su purificación.

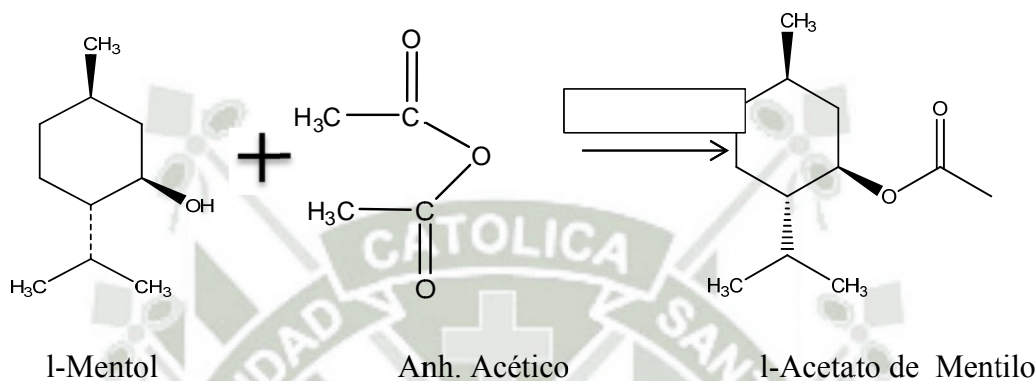


Fig. 3.4: Síntesis de l-Acetato de Mentil

➤ **Purificación:**

- EL proceso de purificación se llevó a cabo mediante destilación al vacío, con una bomba de vacío de 2mmHg de presión, conectada a equipo de destilación de vacío.
- En medio de esta conexión se conectó una trampa de vacío con hielo seco, a fin de bajar la temperatura y mejorar la condensación.
- Se calculó con un nomograma la temperatura aproximada en la que empezaría la destilación, sabiendo que el punto de ebullición del l-Acetato de Mentilo es 229 °C a 1 atmosfera de presión.
- La colección de l-Acetato de Mentilo se dio en tres porciones (cabeza, cuerpo y cola), considerando la porción del cuerpo como la mas pura.
- Se guardó en frasco de vidrio ámbar sellado herméticamente hasta su análisis en el GC-MS.

IMPORTANTE:

- En el proceso de la síntesis de la *l*-Mentona y *l*-Acetato de Mentilo, es importante controlar la temperatura, con la finalidad de que las moléculas no sufran pirólisis.
- Es fundamental realizar los lavados en las proporciones y tiempos indicados, a fin de eliminar todo tipo de impurezas.
- El éxito de la purificación de estas sustancias, parte desde su secado con sulfato de sodio anhidro, la eliminación de solvente en el rota vapor (Condiciones óptimas: Baño María, circulación de agua helada por el refrigerante).
- La purificación será óptima con los cuidados antes mencionados, la presencia de la trampa de hielo seco lo que mejora la condensación y la regulación de temperatura.



Fig.3.5: Purificación de *l*-Mentona y *l*-Acetato de Mentilo

3.3.5. Determinación Cualitativa de *l*-Mentol, *l*-Mentona y *l*-Acetato de Mentilo presente en el AE. de *Mentha piperita L.*

- **Método:** Cromatografía de Capa Fina (CCF.)
- **Procedimiento :**
 - El *l*-mentol, *l*-mentona y *l*-acetato de mentilo, fueron analizados cualitativamente mediante CCF. de la siguiente manera:
 -

a) Preparación de la Fase Móvil²²

- En cuba de vidrio para CCF., colocar la mezcla de la fase móvil: Tolueno-Cloroformo (10+10).
- Se dispersa la fase móvil de manera uniforme por toda la cuba, se tapo y dejo saturar por un periodo de tiempo de 25 minutos.

b) Corrida Cromatográfica

- Se preparó placas de sílica gel de 7 cm de largo x 5 cm de ancho, a las cuales se las lavó con etanol previamente, para limpiarlas.
- Luego se trazó dos márgenes a 1 cm del borde de las placas, uno en la parte superior, y otro en la parte inferior.
- Se sembró el estándar de l-mentol y l-acetato de mentilo, y las muestras de aceite esencial, diluidos en diclorometano.
- Se introdujo las placas dentro de la cuba que contenía la fase móvil, esperando que esta empiece ascender hasta el margen superior.
- Acabada la corrida se dejó secar las placas a temperatura ambiente.

c) Detección**➤ l-Mentol y l-Acetato de Mentilo:²²**

- Se preparó el reactivo revelador: Anisaldehido (1ml) y Ácido sulfúrico concentrado (2ml) en Ácido acético glacial (100ml).
- Se sumergió las placas dentro de la solución reveladora alrededor de 3 a 5 segundos, se retiró cuidadosamente y se secó con una corriente de aire frío (producido por una secadora), hasta que la placa se encuentre seca.
- Se llevó luego a una estufa a temperaturas aproximadas de 90-125°C entre 5 a 10 minutos.
- Aparecen manchas de color azul violeta.

➤ l-Mentona:²²

- Se preparó el reactivo revelador: 2,4 dinitrofenilhidrazina (0.4 g), Ácido sulfúrico concentrado (2ml), 12 ml de etanol 96% (12ml) y agua destilada (3ml).

- Se sumergió las placas dentro de la solución reveladora alrededor de 3 a 5 segundos, se retiró cuidadosamente y se secó con una corriente de aire frío (producido por una secadora), hasta que la placa se encuentre seca.
- Se llevó luego a una estufa a temperaturas aproximadas de 90-125°C entre 5 a 10 minutos.
- Aparecen manchas de color amarillo.

- **Expresión de Resultados:**

El factor de Retención (Rf), se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el soluto}}{\text{Distancia recorrida por la fase móvil}} \quad (\text{Ecuación 3.9})$$

3.3.6. Cuantificación de *l*-Mentol, *l*-Mentona y *l*-Acetato de Mentilo en el Aceite Esencial de *Mentha piperita* L.

A. Método: Cromatografía de Gases acoplada a Detector de Masas (GC-MS)

B. Fundamento: Analizar cuantitativamente muestras en GC-MS, se fundamenta en separar completamente los compuestos, para que así cada compuesto detectado sea puro y su concentración pueda ser determinada.

Esto se consigue llegando al equilibrio de los parámetros Cromatográficos, como la temperatura, presión, flujo, etc., y la elección adecuada de la columna.³³

C. Procedimiento: El procedimiento para trabajar con un GC-MS, se divide en dos partes que comprenden respectivamente en:

➤ **Configuración del equipo:**

- Elegida la columna, y colocada en el horno del equipo, este se prende y se empieza a configurar.
- Esta configuración consiste en poner a punto el equipo (tuning), que son parámetros que se logran automáticamente por el equipo (ejemplo: control del vacío, etc.), parámetros que se comprueban con la línea base. Este proceso se realiza entre 5 a 24 horas aproximadamente.

- Luego se debe ingresar al software y crear el método de análisis correspondiente a todos los parámetros que exige el equipo de acuerdo a la muestra a ser analizada.
- Finalmente se realiza el análisis y se adquiere los datos.

➤ **Análisis Cuantitativo de Muestras:**

- Creado el método, lo primero que se hace es analizar la o las soluciones estándares.
 - Luego se crea la tabla de compuestos y parámetros cuantitativos.
 - Se realiza la curva de calibración.
 - Se analiza la muestra.
 - Finalmente se cuantifica.
- **Parámetros Cromatográficos para el Análisis Cuantitativo de *l*-Mentol, *l*-Mentona y *l*-Acetato de Mentilo en el Aceite Esencial de *Mentha piperita L.***
- Equipo: Cromatógrafo de Gases con Detector de Masas (GC-MS) Shimadzu
 - Auto Inyector AOC Shimadzu
 - Columna: RTX-5MS (5% fenil/95% dimetilpolisiloxano) de 30 m de longitud, 0.25 μ m de espesor y 0.25 mm de diámetro.
 - Gas Carrier: Helio
 - Sistema: temperatura programada
 - Solvente: Diclorometano grado GC
 - Volumen de Inyección : 2 μ l
 - Sampler:
 - Número de lavadas con solvente antes de la corrida: 3
 - Número de lavadas con solvente después de la corrida: 3
 - Número de lavadas del sampler: 3
 - GC (Cromatógrafo de Gases):
 - Temperatura del horno: 40°C
 - Temperatura de la inyección: 240°C
 - Modo de Inyección: Splitless
 - Tiempo de muestreo: 2 minutos

- Modo de control de flujo: Presión
- Presión: 54.2 KPa
- Flujo total: 30.0 ml/min
- Flujo de la columna: 1.06 ml/min
- Velocidad lineal: 37.2 cm/seg
- Flujo de purga: 3.0 ml/min
- Proporción de partida: -1 .0

- Temperatura programada del Horno:

Rate	Final T°	Hold Time
-	40	3
40	110	10
20	200	0
15	240	1

- MS (Espectrómetro de Masas):

- Temperatura de la fuente de ión: 200°C
- Temperatura de la interface: 240°C
- Tiempo de corte del solvente: 5 min
- Tabla de Compuestos:

Retention Time	Identification	Quantification Mode	Injection Volume	Injection Speed	Injection Volume	Injection Speed
		Standard	10	50		0

- Tiempo Total de Corrida: 22.92 min
- Método de Calculo: Estándar Externo

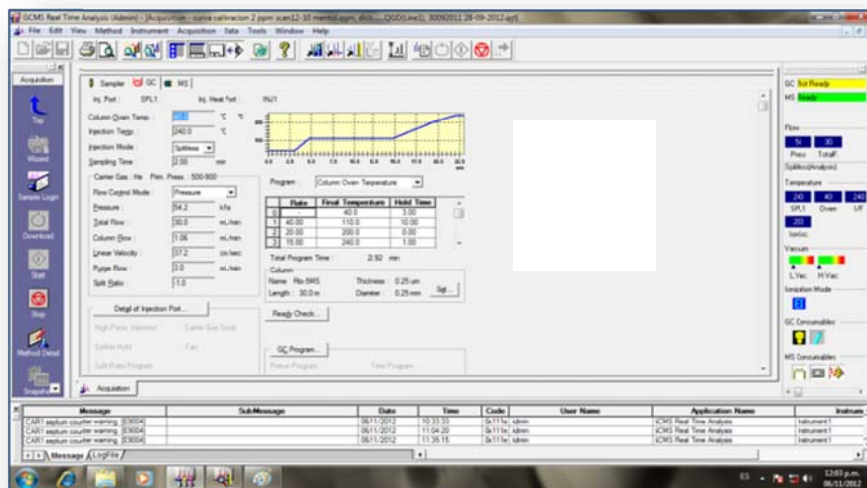


Fig. 3.6: Parámetros Cromatográficos

- **Preparación de las Soluciones Estándares**

- i. **Solución Estándar de *l*-Mentol:**

- Se pesó 5 mg de estándar de *l*-mentol y se diluyó en fiola 10 ml con diclorometano grado GC, resultando una concentración de 500 ppm
- A partir de esta solución, se prepararon 5 soluciones estándar de: 2.1, 2.5, 2.9, 3.3 y 3.7 ppm respectivamente.

- ii. **Solución Estándar de *l*-Mentona:**

- Se pesó 0.0086 g de estándar de *l*-mentona y se diluyó en fiola de 25 ml con diclorometano grado GC, resultando una concentración de 344 ppm.
- Luego se pesó 3.9261 g (2.9835 ml) de solución madre (344 ppm) y se enrazó en fiola de 10 ml con diclorometano, resultando 102.63 ppm.
- A partir de la solución 102.63 ppm, se prepararon 5 soluciones estándar de: 0.9, 3.0, 5.2, 7.2 y 9.1 ppm respectivamente.

- iii. **Solución Estándar de *l*-Acetato de Mentilo:**

- Se pesó 0.0086 g de estándar *l*-acetato de mentilo y se diluyo en fiola de 25 ml con diclorometano grado GC, resultando 344 ppm.
- Luego se pesó 3.9175 g (2.9769 ml) de solución madre (344 ppm) y se enrazó en fiola de 10 ml con diclorometano, resultando 102.41 ppm.

- A partir de esta solución 102.41 ppm, se prepararon 5 soluciones estándar de: 1.0, 3.1, 5.1, 7.2 y 9.1 ppm respectivamente.
- **Preparación de las Soluciones de las muestras de AE. de *Mentha piperita L.***
 - iv. **Preparación de la solución de la muestra de AE.A de *Mentha piperita L.***
 - Se preparó una solución madre, pesando 0.0096 g (0.0126 ml) de muestra de aceite esencial y se diluyó en fiola de 25 ml con diclorometano grado GC.
 - Luego se pesó 0.3914 g (0.3376 ml) y 0.6468 g (0.4915 ml), respectivamente de solución madre y se enrazó en fiola de 10 ml con diclorometano.
 - v. **Preparación de la solución de la muestra de AE.B de *Mentha piperita L.***
 - Se preparó una solución madre, pesando 0.0096g (0.0126 ml) de muestra de aceite esencial y se diluyó en fiola de 25 ml con diclorometano grado GC.
 - Luego se pesó 0.3886 g (0.2953 ml) y 0.6502 g (0.4940 ml), respectivamente de solución madre y se enrazó en fiola de 10 ml con diclorometano.
 - vi. **Preparación de la solución de la muestra de AE.C De *Mentha piperita L.***
 - Se preparó una solución madre, pesando 0.0117 g (0.0154 ml) de muestra de aceite esencial y se diluyó en fiola de 25 ml con diclorometano.
 - Luego se pesó 0.3962 g (0.3010 ml) y 0.6573 g (0.4994 ml), respectivamente de solución madre y se enrazó en fiola de 10 ml con diclorometano.
- ❖ Los ajustes de g a ml en la preparación de las soluciones se realizaron teniendo en cuenta la densidad del diclorometano $1.131593 \frac{g}{ml}$. Se realizó de esta manera para obtener mayor precisión y exactitud en los cálculos y considerando que la concentración se expresa en ppm $\left(\frac{mg}{L}\right)$

- **Idoneidad del Sistema**

- a) **Coefficiente de reparto (k)**

Es la concentración en fase líquida o gaseosa necesaria para eluir un compuesto después del volumen inicial contenido en la columna (tm).³³

Este factor determina la retención del soluto y se calcula según ecuación:

$$k = \frac{(tr - tm)}{tm} \quad (\text{Ecuación 3.10})$$

Donde:

- tr = tiempo de retención del compuesto
- tm = tiempo en el que el compuesto no retenido pasa por el interior del sistema.

b) Números de Platos Teóricos (N)

Este parámetro muestra la eficiencia de la columna, donde un valor alto significa mejor eficiencia.³³

El cálculo se basa en la relación entre el tiempo de retención y la anchura de pico cromatográfico, y se calcula según ecuación:

$$N = 16 \times (t/w)^2 \quad (\text{Ecuación 3.11})$$

Donde:

- t = tiempo de retención
- w = anchura del pico en la línea de base determinado por la tangente ajustada a un porcentaje de altura del pico.

c) Altura Equivalente al Plato Teórico (HETP)

Este parámetro muestra la eficiencia de la columna un valor pequeño significa mejor eficiencia.³³

Este parámetro se calcula según ecuación 3.12:

$$HETP = \frac{L}{N} \quad (\text{Ecuación 3.12})$$

Donde:

- L = longitud de la columna en cm o mm
- N = número de platos teóricos.

d) Resolución (R)

Es la medida de la separación entre dos picos. Este parámetro resulta muy útil para controlar el comportamiento de posibles interferencias.³³

Este parámetro se calcula según ecuación 3.13:

$$R = 2 \frac{V_2 - V_1}{\frac{1}{2}(W_1 + W_2)} \quad (\text{Ecuación 3.13})$$

Donde:

- V_2 y V_1 = tiempo de retención
- W_1 y W_2 = anchura del pico

D. Expresión de Resultados

- Primero se analizó los estándares l-Mentol, l-Mentona y l-Acetato de Mentilo, obteniendo sus espectros, los que fueron comparados con la bibliografía. Se obtuvo sus tiempos de retención.
- Luego se elaboraron las curvas de calibración respectivas a cada estándar, obteniendo las ecuaciones de regresión lineal.
- Se analizaron las muestras de aceite esencial de *Mentha piperita L.*, obteniéndose sus espectros, tiempos de retención, y áreas bajo la curva, las cuales fueron interpoladas con sus respectivas ecuaciones de regresión lineal.
- Finalmente se realizan los cálculos tomando en cuenta las diluciones de las muestras que se hicieron para preparar la solución de análisis, obteniéndose una concentración final, que se puede expresar en g/ml, tomando en cuenta la densidad de cada muestra de aceite esencial de *Mentha piperita L.*, obtenido en las características fisicoquímicas.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. OBTENCIÓN DE AE. DE *Mentha piperita L.*

Se obtuvo el AE. de *Mentha piperita L.* siguiendo el procedimiento 3.3.1.

4.1.1. Rendimiento:

El rendimiento de aceite esencial de *Mentha piperita L.* de las tres muestras de aceite esencial obtenido, se expresaron en porcentaje de rendimiento, según ecuación 3.1. Lo que se expresa en las tablas 4.1, 4.2 y 4.3.

Tabla 4.1. Muestra A - Porcentaje de Rendimiento de AE. de *Mentha piperita L.*

Peso de Menta (g)	Peso del A.E. obtenido (g)	% Rendimiento
101.83	1.14	1.11
101.76	1.16	1.14
101.79	1.22	1.19
101.91	1.11	1.09
101.87	1.28	1.26
101.89	1.27	1.25
101.86	1.28	1.26
101.88	1.17	1.15
101.84	1.16	1.14
101.86	1.19	1.17
Promedio		1.18

Tabla 4.2. Muestra B - Porcentaje de Rendimiento de AE. de *Mentha piperita L.*

Peso de Menta (g)	Peso del A.E. obtenido (g)	% Rendimiento
101.80	0.66	0.65
101.72	0.63	0.62
101.68	0.60	0.59
101.74	0.64	0.63
101.78	0.60	0.59
101.85	0.61	0.59
101.76	0.64	0.63
101.73	0.61	0.59
101.83	0.55	0.64
101.68	0.66	0.59
Promedio		0.61

Tabla 4.3. Muestra C - Porcentaje de rendimiento de AE. de *Mentha piperita L.*

Peso de Menta (g)	Peso del A.E. obtenido (g)	% Rendimiento
101.52	0.87	0.85
101.61	0.95	0.93
101.74	0.91	0.89
101.61	0.89	0.87
101.67	0.86	0.84
101.61	0.9	0.88
101.61	0.92	0.90
101.69	0.88	0.87
101.60	0.91	0.89
101.66	0.84	0.85
Promedio		0.88

Los porcentajes de rendimiento de aceite esencial de *Mentha piperita L.* mencionados en literaturas son: ^{16, 34, 36}

- 0.5% a 1% ¹⁶
- 0.1% a 1% ³⁴
- 0.2 a 0.5 % (material oreado) y 1 a 2.5% (material seco).³⁶

Estos valores de literatura se aproximan entre si a un porcentaje de rendimiento de aceite esencial de *Mentha piperita L.* de 0.5 a 1%.

Como se observa en las tablas 4.1, 4.2 y 4.3, los porcentajes de rendimiento de AE. De *Mentha piperita L.* reportados en este trabajo de investigación, se encuentran dentro de los valores establecidos en las distintas literaturas.

Sin embargo a la hora de evaluar el rendimiento de aceite esencial , tenemos que considerar que estos pueden variar según el origen de la planta, condiciones climáticas, secado de la Planta (considerado el secado por muchos autores y trabajos de investigación como un factor favorable en la mejora de rendimiento por evaporación del agua) y es a la vez este factor motivo de estudio constante, ya que determinar una técnica (secado al ambiente o desecadores industriales) y temperatura de secado así como su almacenamiento después de la cosecha, un factor determinante en la mejora de rendimiento y calidad en el proceso productivo de los aceites esenciales.

4.2. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

Se evidencia en este trabajo de investigación buenas características de olor, color y sabor en las tres muestras de AE. de *Mentha piperita L.*, sin partículas en suspensión, ni rastros de agua o solvente.

Estos resultados se expresan en la tabla 4.4:

Tabla 4.4: Características Organolépticas de las tres muestras AE. de *Mentha piperita L.* (Muestra A, Muestra B y Muestra C)

Características Organolépticas	Olor	Sabor	Color
AE.A	Característico	Picante	Verde claro-traslucido
AE.B	Característico	Picante	Verde claro-traslucido
AE.C	Característico	Picante	Verde claro-traslucido

Estas características organolépticas propias de un buen aceite de *Mentha piperita L.*, se lograron al tener en cuenta los parámetros establecidos en el procedimiento 3.3.1.:

- El baño de aceite, contribuyó a controlar la temperatura del sistema, evitando sobrepasar los 120°C impidiendo la formación de un olor empireumático (“quemado”). Por lo tanto el olor de los tres AE.s. de *Mentha piperita L.* fueron característicos (fresco, penetrante)
- La selección del solvente utilizado para la separación de la fase acuosa y orgánica, es fundamental. Se utilizó diclorometano que posee un punto de ebullición de 40°C, lo que asegura la remoción del agua que pudiese contener la fase orgánica.
- La eliminación del solvente del aceite esencial, se dio en la rota vapor.

Es importante mencionar que después de obtenidas las tres muestras de aceite esencial de *Mentha piperita L.*, estas fueron almacenadas en frascos ámbar, sellados herméticamente y bajo refrigeración, hasta su cuantificación. En este tiempo no se evidenció presencia de agua dentro del frasco, ni partículas extrañas, manteniendo sus características ya mencionadas.

Finalmente estos resultados nos indican de manera general que el método de destilación empleado, y el cumplimiento de los parámetros ya mencionados contribuyeron a obtener tres muestras de aceite esencial de buena calidad.

4.3. DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DE LAS TRES MUESTRAS (A, B y C) DE ACEITE ESENCIAL OBTENIDO DE *Mentha piperita L.*

Siguiendo el procedimiento 3.2.2 para la determinación de las principales características físicoquímicas, se elaboró la tabla 4.5 donde se muestran los resultados obtenidos:

Tabla 4.5: Características Físicoquímicas determinadas para las muestras de AE. de *Mentha piperita L.* (Muestra A, Muestra B y Muestra C)

Características Físicoquímicas	Resultados		
	A.E. A	A.E. B	A.E. C
Poder rotatorio	-30°	-27.5°	-27.5°
Densidad	0.8991g/ml	0.8994 g/ml	0.8987 g/ml
Índice de refracción	1.4643	1.4573	1.4622
Índice de acidez	1.6715 $\frac{mgKOH}{g \text{ aceite}}$	1.6861 $\frac{mgKOH}{g \text{ aceite}}$	1.5759 $\frac{mgKOH}{g \text{ aceite}}$

A. Determinación de Poder Rotatorio:

La determinación del poder rotatorio de las tres muestras de aceite esencial de *Mentha piperita L.*, se determinó según procedimiento 3.3.3:

- Las lecturas directas del polarímetro para las tres muestras de aceite fueron :
A: -0.60° B: -0.55° C: -0.55°
- La longitud de tubo utilizada fue 100 mm (1dm)

$$\bullet \alpha_{D.A.E.A}^{20^{\circ}C} = \frac{-0.60^{\circ} \times 50}{1 \times 1} \quad (\text{Ecuación 3.2})$$

$$\alpha_{D.A.E.A}^{20^{\circ}C} = -30^{\circ}$$

- $\alpha_{D A.E. B}^{20^{\circ}C} = \frac{-0.55^{\circ} \times 50}{1 \times 1}$ (Ecuación 3.2)

$$\alpha_{D A.E. B}^{20^{\circ}C} = 27.5^{\circ}$$

- $\alpha_{D A.E. C}^{20^{\circ}C} = \frac{-0.55^{\circ} \times 50}{1 \times 1}$ (Ecuación 3.2)

$$\alpha_{D A.E. C}^{20^{\circ}C} = 27.5^{\circ}$$

El poder rotatorio de un aceite esencial es una característica resultante de la suma de las rotaciones ópticas de sus constituyentes.

Para el aceite esencial de *Mentha piperita* se indican valores de -10° a -30° (NTP)³⁴ (BP)³⁶, -18° a -32° (USP).¹⁹

Los valores obtenidos en las tres muestras de AE. de *Mentha piperita L.* evaluadas, se encuentran dentro de los valores estipulados por las normas antes mencionadas. Por lo tanto, estos resultados son criterios importantes de identidad y pureza de las muestras obtenidas.

B. Determinación de la Densidad:

La densidad de las tres muestras de aceite esencial de *Mentha piperita L.* se realizaron según el procedimiento 3.3.3:

- $Vl_R = \frac{1.0189 \frac{g}{ml}}{0.9984 \frac{g}{ml}} = 1.0205 \text{ ml}$ (Ecuación 3.3)

- $\rho A. E. A = \frac{0.9176 \text{ g}}{1.0205 \text{ ml}} = 0.8991 \frac{\text{g}}{\text{ml}}$ (Ecuación 3.4)

- $\rho A. E. B = \frac{0.9180 \text{ g}}{1.0205 \text{ ml}} = 0.8994 \frac{\text{g}}{\text{ml}}$ (Ecuación 3.4)

- $\rho A. E. C = \frac{0.9173 \text{ g}}{1.0205 \text{ ml}} = 0.8987 \frac{\text{g}}{\text{ml}}$ (Ecuación 3.4)

Para el aceite esencial de *Mentha piperita L.* se indican valores de 0.9 g/ml a 0.916 g/ml (NTP)³⁴, (BP)³⁶ y 0.896 a 0.908 (USP).¹⁹

Los valores obtenidos en las tres muestras de aceite esencial de *Mentha piperita L.* evaluadas se encuentran dentro de los valores estipulados por las normas antes

mencionadas. Por lo tanto estos resultados nos sirven como criterio de pureza, ya que en el control de calidad de aceites esenciales se manejan rangos estrechos de densidades.

C. Determinación de Índice de Refracción:

La determinación de las tres muestras de aceite esencial de *Mentha piperita L.* se determinaron según procedimiento 3.3.3:

- Las lecturas directas del refractómetro de Abbe fueron:

A: 1.4642 B: 1.4574 C: 1.4624

- AE.A $n_d^t = 1.4642 + 0.0004 (20.3 - 20^\circ\text{C})$ (Ecuación 3.5)
 $n_d^t = 1.4643$
- AE.B $n_d^t = 1.4574 + 0.0004 (19.8 - 20^\circ\text{C})$ (Ecuación 3.5)
 $n_d^t = 1.4573$
- AE.C $n_d^t = 1.4624 + 0.0004 (19.6 - 20^\circ\text{C})$ (Ecuación 3.5)
 $n_d^t = 1.4622$

Para el aceite esencial de *Mentha piperita L.*, se indican valores de 1.4600 a 1.4670 (NTP),³⁴ 1.457 a 1.467 (BP)³⁶ y 1.459 a 1.465 (USP).¹⁹

Los valores obtenidos en las tres muestras de aceite esencial de *Mentha piperita L.* evaluadas se encuentran dentro de los valores estipulados en las normas antes mencionadas.

D. Determinación del Índice de Acidez:

Los índices de acidez de las tres muestras de aceite esencial de *Mentha piperita L.* se determinaron según procedimiento 3.3.3:

- Índice de Acidez A.E. A = $\frac{56.1(0.4) \times 0.008}{0.1074} = 1.6715 \frac{\text{mgKOH}}{\text{g aceite}}$ (Ecuación 3.6)

- Índice de Acidez A.E. B = $\frac{56.1 (0.6) \times 0.008}{0.1597} = 1.6861 \frac{mgKOH}{gaceite}$ (Ecuación 3.6)
- Índice de Acidez A.E. C = $\frac{56.1 (0.5) \times 0.008}{0.1423} = 1.5759 \frac{mgKOH}{gaceite}$ (Ecuación 3.6)

Los valores de índice de acidez de un aceite aumenta a medida que envejece. Por lo que los valores obtenidos en las tres muestras de aceite esencial de *Mentha piperita L.* evaluadas se pueden considerar bajos, teniendo en cuenta que fueron almacenados en frasco ámbar, sellado herméticamente, bajo refrigeración, y además que este y los demás parámetros fisicoquímicos se evaluaron poco tiempo después de su extracción.

4.4. Síntesis y Purificación de Estándares de *l*-Mentona y *l*-Acetato de Mentilo

Para evaluar el contenido de mentol, mentona y acetato de mentilo en las tres muestras de aceite esencial de *Mentha piperita L.*, mediante cuantificación por método de patrón externo, en GC-MS, es de vital importancia contar con los estándares respectivos.

A partir del estándar de *l*-mentol de referencia, es que se sintetizó y purificó los estándares de mentona y acetato de mentilo, llevando a cabo cuidadosamente cada uno de los parámetros establecidos en el punto 3.3.4.

a) Poder Rotatorio del Estándar de *l*-Mentol

- $\alpha^{20^{\circ}C}_{D.A.E.A} = \frac{-1.00 \times 50^{\circ}}{1 \times 1}$ (Ecuación 3.2)

$$\alpha^{20^{\circ}C}_{D.A.E.A} = -50^{\circ}$$

b) Análisis de los Estándares *l*-Mentol, *l*-Mentona y *l*-Acetato de Mentilo por GC-MS

Evaluado el poder rotatorio del estándar de *l*-mentol, sintetizado y purificado los estándares de *l*-mentona y *l*-acetato de mentilo, estos tres fueron analizados por GC-MS, bajo los parámetros establecidos en el punto 3.3.6, obteniendo los Espectros de Masa correspondientes, verificando los iones de referencia (target ions) con la bibliografía y la Biblioteca Virtual del Software GC SOLUTION del GC-MS, en el que se realizó el análisis.

Los espectros de masa obtenidos se muestran a continuación

Fig.4.1: Espectro de Masa del Estándar *l*-Mentol

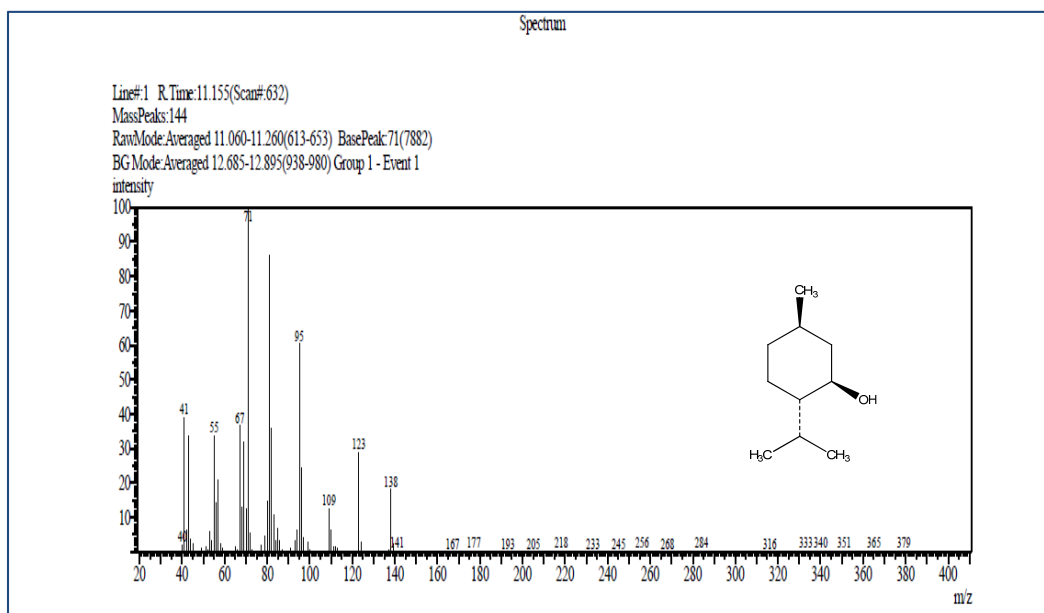


Fig.4.2: Espectro de Masa del Estándar *l*-Mentona

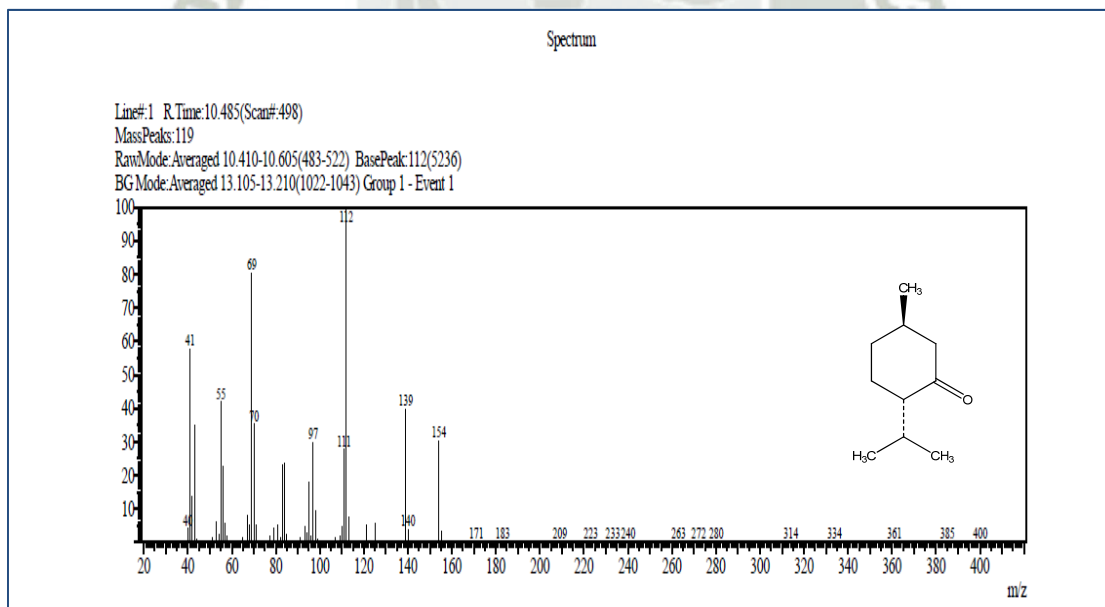
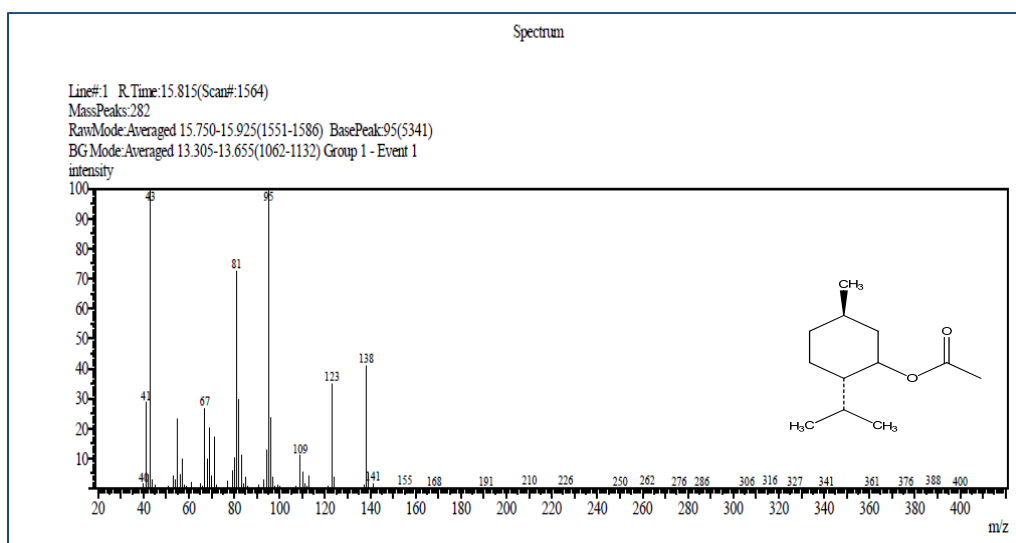


Fig.4.3: Espectro de Masa del Estándar *l*-Acetato de Mentilo

Iones de Referencia mencionados en literatura: (SDBS)³⁷(NIST)³⁸

- Mentol: 71-81-95^{37, 38}
- Mentona: 112-69-41^{37, 38}
- Acetato de Mentilo: 95-43-81^{37,38}

Realizando las respectivas comparaciones entre los espectros de masa obtenidos en el análisis contra los obtenidos de literatura se puede observar que los iones de referencia son iguales, lo que nos indica claramente que la síntesis y purificación de los estándares mentona y acetato de mentilo, se llevaron a cabo de manera adecuada, así como también, seguir de manera ordenada y minuciosa el protocolo 3.34. de síntesis y purificación, permitió obtener los estándares deseados y solucionar uno de los grandes problemas en los trabajos e investigación realizados por estudiantes de farmacia, que es la adquisición de estándares, los cuales tiene un precio muy elevado en el mercado, y que se convierten muchas veces un factor limitante para trabajos de investigación.

Con este análisis también, se puede resaltar la importancia de la Técnica de Cromatografía Gaseosa acoplada a un Espectrómetro de Masas, en la obtención de los perfiles cromatográficos, como medio de separación de compuestos orgánicos, identificación, cuantificación, evaluación, de muestras complejas como es el caso de mezclas de estándares, aceites esenciales, etc.

DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE *l*-MENTOL, *l*-MENTONA Y *l*-ACETATO DE MENTILO EN LAS TRES MUESTRAS DE ACEITE ESENCIAL DE *Mentha piperita L.*

La determinación cualitativa de *l*-mentol, *l*-mentona y *l*-acetato de mentilo en las tres muestras de aceite esencial de *Mentha piperita L.* obtenidas así como en los estándares correspondientes se hizo según procedimiento 3.3.5, lo que se expresa en la tabla 4.6:

Tabla 4.6: Rf para Estándares y Muestras de AE. de *Mentha piperita L.* (Muestra A, Muestra B y Muestra C) *l*-Mentol, *l*-Mentona y *l*-Acetato de Mentilo

Componentes químicos	Fase Móvil: Tolueno – Cloroformo Revelador: Anisaldehído –Ac. Sulfúrico	Fase móvil: Tolueno-Cloroformo Revelador: 2,4 dinitrofenilhidrazina	
	<i>l</i> -Mentol	<i>l</i> -Acetato de Mentilo	<i>l</i> -Mentona
Rf. Estándar	0.48	0.82	0.64
Rf. A.E. A	0.48	0.82	0.64
Rf. A.E. B	0.48	0.82	0.64
Rf. A.E. C	0.48	0.82	0.64

-Rf para el estándar de *l*-Mentol

- $Rf = \frac{2.4 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0.48$ (Ecuación 3.9)

- Rf para el estándar *l*-Acetato de Mentilo

- $Rf = \frac{4.1 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0.82$ (Ecuación 3.9)

- Rf para estándar *l*-Mentona

- $Rf = \frac{3.2 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0.64$ (Ecuación 3.9)

La fuerza de elución de los solventes que aumenta con la polaridad, es de 0.29 para el tolueno y 0.40 para el cloroformo, mostrando que estos solventes y las proporciones utilizadas fueron adecuadas para realizar la cromatografía de capa fina. Ya que

las manchas y sus respectivas coloraciones corresponden al *l*-mentol, *l*-mentona y *l*-acetato de mentilo.

Los Rf. obtenidos tanto como las manchas (azul violeta para *l*-mentol y *l*-acetato de mentilo, amarilla para *l*-mentona)²², para los estándares y las 3 muestras de aceite esencial de *Mentha piperita L.* comprueban el proceso de síntesis y purificación de los estándares, así como la existencia de los componentes químicos *l*-Mentol, *l*-Mentona y *l*-Acetato de Mentilo en las tres muestras de aceite esencial de *Mentha piperita L.*

Fig.4.4: CCf. Estándares de *l*-Mentol y *l*-Acetato de Mentilo

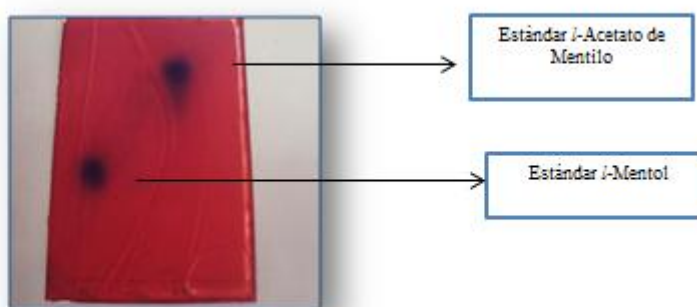


Fig.4.5: Estándar de *l*-Mentona vs Muestras A, B y C de AE. De *Mentha Piperita L.*

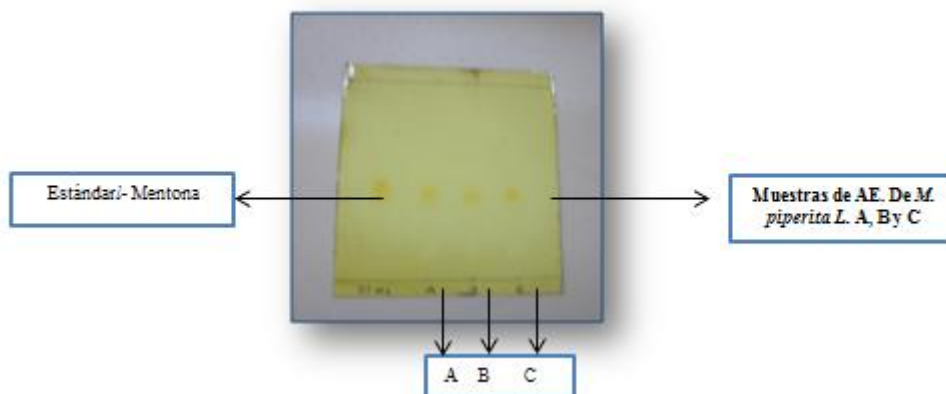
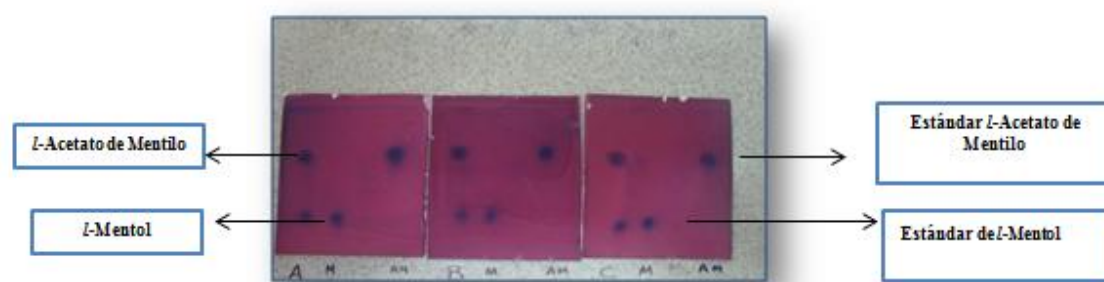


Fig.4.6: Muestras A, B y C de AE. De *Mentha piperita L.* vs Estándares de *l*-Mentol y *l*-Acetato de Mentilo



4.6. CUANTIFICACIÓN DE *l*-MENTOL, *l*-MENTONA Y *l*-ACETATO DE MENTILO EN LAS TRES MUESTRAS DE AE. (A, B Y C) DE *Mentha piperita L.*

La cuantificación de *l*-Mentol, *l*-Mentona y *l*-Acetato de Mentilo en las tres muestras de aceite esencial de *Mentha piperita L.* Se realizó según procedimiento 3.3.6, obteniendo los siguientes resultados:

A) Idoneidad del Sistema

Se evaluaron los parámetros de idoneidad del sistema tanto para los estándares *l*-mentol, *l*-mentona y *l*-acetato de mentilo, así como para las tres muestras de aceite esencial de *Mentha piperita*, lo que se expresa a continuación en las tablas 4.7 y 4.8

Tabla 4.7: Parámetros de Idoneidad de Sistema para los estándares *l*-mentol, *l*-mentona y *l*-acetato de mentilo.

Tr	Estándar	Coefficiente de Reparto (K)	Numero de platos teóricos (N)	Altura equivalente al plato teórico (HETP)	Resolución (R)
10.479	<i>l</i> -Mentona	0.000	114223	0.000	-
11.123	<i>l</i> -Mentol	0.067	111584	0.000	5.457
15.811	<i>l</i> -Acetato de mentilo	0.392	598087	0.000	32.493

Tabla 4.8: Parámetros de Idoneidad de Sistema para las tres muestras (A, B y C) de Aceite Esencial de *Mentha piperita L.*

Muestras	tr	Compuestos químicos	Coefficiente de Reparto (K)	Numero de platos teóricos (N)	Altura equivalente al plato teórico (HETP)	Resolución (R)
A.E. A	10.479	<i>l</i> -Mentona	0.000	110372	0.000	-
	11.123	<i>l</i> -Mentol	0.068	106639	0.000	5.385
	15.81	<i>l</i> -Acetato de mentilo	0.391	600393	0.000	31.941
A.E. B	10.479	<i>l</i> -Mentona	0.000	115597	0.000	-
	11.123	<i>l</i> -Mentol	0.068	105311	0.000	5.441
	15.81	<i>l</i> -Acetato de mentilo	0.392	589824	0.000	31.736
A.E. C	10.479	<i>l</i> -Mentona	0.000	112715	0.000	-
	11.123	<i>l</i> -Mentol	0.068	107643	0.000	5.422
	15.81	<i>l</i> -Acetato de mentilo	0.392	585600	0.000	31.976

Los parámetros K, N, HETP y R, tanto para los estándares como para las tres muestras de AE. de *Mentha piperita L.* coinciden entre si, y son valores obtenidos del software GC Solution del GC-MS Shimatzu, que nos indican la idoneidad del sistema para llevar a cabo la cuantificación de *l*-mentol, *l*-mentona ya *l*-acetato de mentilo en las tres muestras.

B) Concentraciones y Áreas para los Estándares

Se procedió a realizar las lecturas en el GC-MS de las soluciones estándares de *l*-mentol, *l*-mentona y *l*-acetato de mentilo, hallando sus áreas bajo la curva correspondientes a cada concentración (ppm) determinadas en el punto 3.3.6, para la elaboración de sus curvas de calibración y llevar a cabo la cuantificación por método de patrón externo.

Estas concentraciones y áreas bajo la curva para las soluciones estándares de *l*-mentol, *l*-mentona y *l*-acetato de mentilo se expresan a continuación en las tablas 4.9, 4.10 y 4.11:

Tabla 4.9: Concentraciones y Áreas para la Curva de Calibración del *l*-Mentol

Concentración (ppm)	Área 1	Área 2	Área 3	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación
2,1	461745	460438	464392	462191,667	2014,48811	0,43585557
2,5	677178	669865	678542	675195	4666,02604	0,69106348
2,9	826113	829342	828751	828068,667	1719,24237	0,20762075
3,3	1067608	1054314	1036891	1052937,67	15404,6825	1,46301941
3,7	1237613	1195446	1189732	1207597	26151,1499	2,16555274

Tabla 4.10: Concentraciones y Áreas para la Curva de Calibración de la I-Mentona

Concentración (ppm)	Área 1	Área 2	Área 3	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación
0,9	66609	66835	65468	66304	732,762581	1,10515592
3	199936	194873	192547	195785,333	3778,04107	1,92968544
5,2	340221	337985	341528	339911,333	1791,68422	0,52710341
7,2	453481	451687	459871	455013	4301,71268	0,94540435
9,1	563421	563309	560598	562442,667	1598,50941	0,28420842

Tabla 4.11: Concentraciones y Áreas para la Curva de Calibración del I-Acetato de Mentilo

Concentración (ppm)	Área 1	Área 2	Área 3	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación
1	77359	77048	77693	77366,6667	322,568339	0,41693452
3,1	157299	155326	155157	155927,333	1190,8998	0,76375307
5,1	245516	247134	246781	246477	850,760248	0,34516821
7,2	330264	330215	334163	331547,333	2265,36627	0,68327085
9,1	418855	413583	417669	416702,333	2765,74209	0,66372129

C) Curvas de Calibración

A partir de los datos obtenidos (Áreas), se construyen las Curvas de Calibración, las que se muestran a continuación:

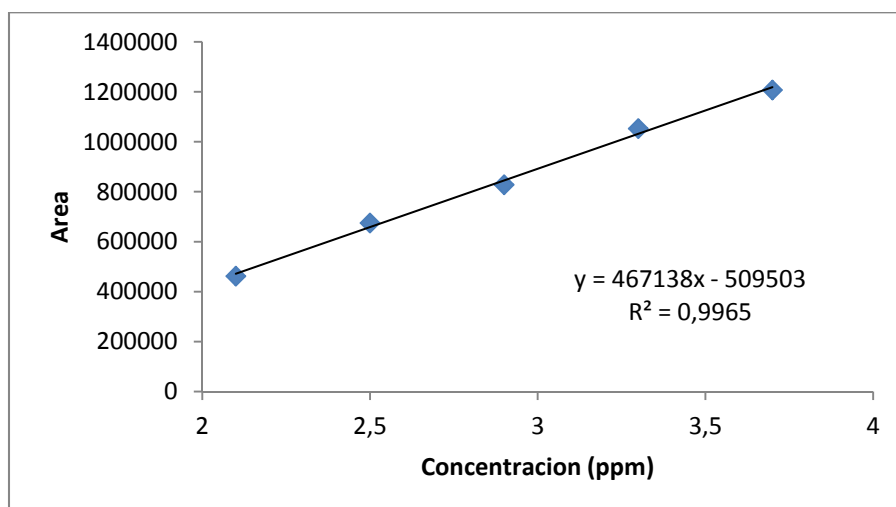


Fig.4.7: Curva de Calibración del Estándar I-Mentol

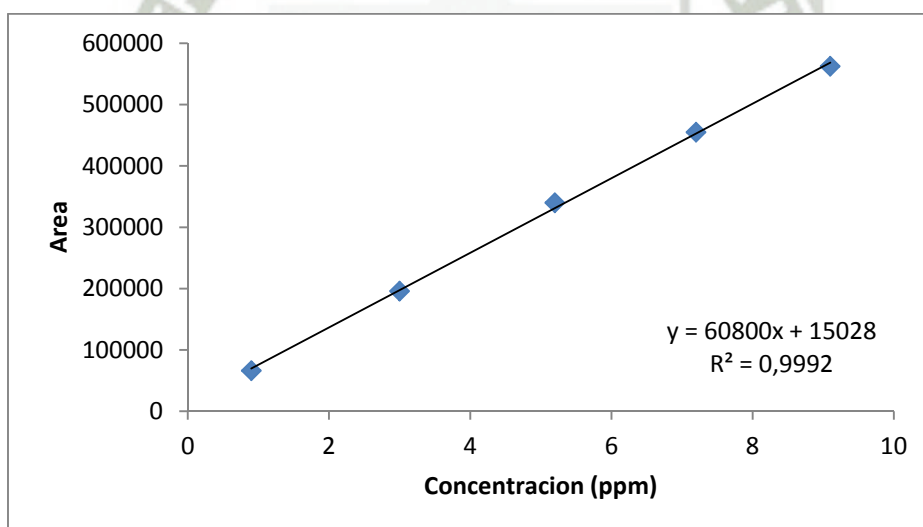


Fig.4.8: Curva de Calibración del Estándar I-Mentona

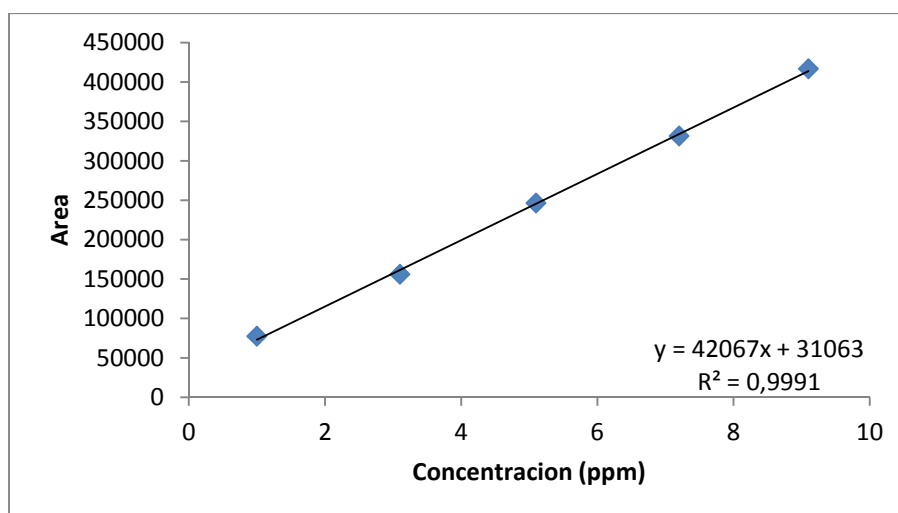


Fig.4.9: Curva de Calibración del Estándar de l-Acetato de Mentilo

D) Tiempos de Retención y Áreas de las tres muestras de AE. de *Mentha piperita L.*

- **Muestra de AE.A**

Se preparó una solución madre pesando 0.0096 g (0.0126 ml) de la muestra A. del AE. de *Mentha piperita L.* obtenido y se enrasó en una fiola de 25 ml con diclorometano grado GC.

De esta solución madre se pesó una alícuota de 0.3914 g (0.3376ml) y se realizó la corrida cromatográfica por triplicado en el GC-MS obteniendo el siguiente resultado expresado en la tabla 4.12:

Tabla 4.12: Tiempos de Retención y Áreas de la muestra a del AE. A de *Mentha piperita L.*

Tr	Compuesto	Área 1	Área 2	Área 3	Promedio
10.479	Mentol	225895	227635	223582	225704
11.123	Mentona	402260	400598	403621	4 02159.667
15.811	Acetato de Mentilo	306618	307241	309586	307815

Como se observa el área promedio del Mentol en la muestra A del AE. De *Mentha piperita L.* obtenido no cae dentro de su respectiva curva de calibración (Tabla

4.9), por lo que se preparó una solución más tomando una alícuota de la solución madre anterior pesando 0.6468 g (0.4915ml) y se realizó una nueva lectura obteniendo los siguientes resultados expresados en la tabla 4.13:

Tabla 4.13: Tiempos de Retención y Áreas de la muestra del AE.A de *Mentha piperita* L.

tr	Compuesto	Área 1	Área 2	Área 3	Promedio
10.479	Mentol	5305	1523	6146	4324.667
11.123	Mentona	9542	7841	8057	8480
15.811	Acetato de Mentilo	1869	1093	7885	3615.667

- **Muestra de AE.B**

Se preparó una solución madre pesando 0.0096 g (0.0126 ml) de la muestra B del aceite esencial de *Mentha piperita* L. obtenido y se enrasó en una fiola de 25 ml con diclorometano grado GC.

De esta solución madre se pesó una alícuota de 0.3886g (0.2953ml) y se realizó la corrida cromatográfica por triplicado en el GC-MS obteniendo los siguientes resultados expresados en la tabla 4.14:

Tabla 4.14: Tiempos de Retención y Áreas de la muestra del AE.B de *Mentha piperita* L.

tr	Compuesto	Área 1	Área 2	Área 3	Promedio
10.479	Mentona	6711	5863	2548	5040.667
11.123	Mentol	7184	8169	9375	8242.667
15.811	Acetato de Mentilo	0449	1623	9851	3974.333

Como se observa el área promedio del Mentol en la muestra B del AE. De *Mentha piperita* L. obtenido no cae dentro de su respectiva curva de calibración (Tabla 4.9), por lo que se preparó una solución mas tomando una alícuota de la solución

madre anterior pesando 0.6502 g (0.4940ml) y se realizó una nueva lectura obteniendo los siguientes resultados expresados en la tabla 4.15:

Tabla 4.15: Tiempos de Retención y Áreas de la muestra del AE.B de *Mentha piperita L.*

Tr	Compuesto	Área 1	Área 2	Área 3	Promedio
10.479	Mentona	250815	254693	254187	253231.667
11.123	Mentol	553566	556928	550514	553669.33
15.811	Acetato de Mentilo	630695	637132	639576	635801

- **Muestra de AE.C**

Se preparó una solución madre pesando 0.0117 g (0.0154 ml) de la muestra C del aceite esencial de *Mentha piperita L.* obtenido y se enrasó en una fiola de 25 ml con diclorometano grado GC.

De esta solución madre se pesó una alícuota de 0.3962g (0.3011ml) y se realizó la corrida cromatográfica por triplicado en el GC-MS obteniendo los siguientes resultados expresados en la tabla 4.16:

Tabla 4.16: Tiempos de Retención y Áreas de la muestra del AE.C de *Mentha piperita L.*

Tr	Compuesto	Área 1	Área 2	Área 3	Promedio
10.479	Mentona	127270	129443	128895	128536
11.123	Mentol	281788	285641	284379	283936
15.811	Acetato de mentilo	381183	381974	382557	381904.667

Como se observa el área promedio del Mentol en la muestra C del AE. De *Mentha piperita L.* obtenido no cae dentro de su respectiva curva de calibración, por lo que se preparó una solución más tomando una alícuota de la solución madre anterior pesando 0.6573 g (0.4994ml) y se realizó una nueva lectura obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 4.17: Tiempos de Retención y Áreas de la muestra del AE.C De *Mentha piperita L.*

Tr	Compuesto	Área 1	Área 2	Área 3	Promedio
10.479	Mentona	261600	264568	261887	262685
11.123	Mentol	663089	664953	661542	663194.66'
15.811	Acetato de mentilo	837469	839578	838124	838390.33'

E) Cuantificación:

Construidas las Curvas de Calibración de mentol, mentona y acetato de mentilo, obteniendo sus respectivas ecuaciones de regresión lineal ($y = a + bx$), así como el área promedio de las tres muestras de aceite esencial de *Mentha piperita* obtenido (A, B y C), se procede según procedimiento 3.3.6, calculando el contenido de l-mentol, l-mentona y l-acetato de mentilo expresado en g/ml de aceite esencial, tomando en cuenta las diluciones realizadas para el análisis y las densidades obtenidas de cada muestra de aceite esencial de *Mentha piperita L.*

i. Cuantificación de l-Mentol

- Muestra AE.A de *Mentha piperita L.*

$$y = 467138x - 509503$$

$$628480 = 467138x - 509503$$

$$x = \frac{628480 + 509503}{467138}$$

$$x = 2.4360 \text{ ppm}$$

Conociendo la densidad del AE.A que es 1.8991 g/ml, se calcula la cantidad de l-mentol en % w/w

$$2.4360 \text{ ppm} \times \frac{25 \text{ ml}}{0.0126 \text{ ml}} \times \frac{10 \text{ ml}}{0.4915 \text{ ml}} = 98341.24562 \text{ ppm}$$

$$98341.24562 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}} = 0.098341245 \frac{\text{g}}{\text{ml}}$$

$$1 \text{ ml AE.A.} \rightarrow 0.8991 \text{ g} \rightarrow 100\%$$

$$1 \text{ ml AE.A.} \rightarrow 0.098341245 \text{ g mentol} \rightarrow x$$

$$x = 10.93\% \text{ de l-Mentol}$$

- **Muestra AE.B de *Mentha piperita* L.**

$$y = 467138 x - 509503$$

$$553669.33 = 467138 x - 509503$$

$$x = \frac{553639.33 + 509503}{467138}$$

$$x = 2.2759 \text{ ppm}$$

Conociendo la densidad del AE.B que es 1.8994 g/ml, se calcula la cantidad de l-mentol en % w/w

$$2.2759 \text{ ppm} \times \frac{25 \text{ ml}}{0.0126 \text{ ml}} \times \frac{10 \text{ ml}}{0.4940 \text{ ml}} = 91411.22036 \text{ ppm}$$

$$91411.22036 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}} = 0.09141122036 \frac{\text{g}}{\text{ml}}$$

$$1 \text{ ml AE.B} \rightarrow 0.8994 \text{ g} \rightarrow 100 \%$$

$$1 \text{ ml AE.B} \rightarrow 0.0914112236 \text{ g mentol} \rightarrow x$$

$$x = 10.16 \% \text{ de l-Mentol}$$

- **Muestra AE.C de *Mentha piperita L.***

$$y = 467138 x - 509503$$

$$663194.667 = 467138 x - 509503$$

$$x = \frac{663194.667 + 509503}{467138}$$

$$x = 2.5103 \text{ ppm}$$

Conociendo la densidad del AE.C que es 1.8987 g/ml, se calcula la cantidad de l-mentol en % w/w

$$2.5103 \text{ ppm} \times \frac{25 \text{ ml}}{0.0154 \text{ ml}} \times \frac{10 \text{ ml}}{0.4994 \text{ ml}} = 81601.1681 \text{ ppm}$$

$$81601.1681 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}} = 0.081601.1681 \frac{\text{g}}{\text{ml}}$$

$$1 \text{ ml AE.C} \rightarrow 0.8987 \text{ g} \rightarrow 100 \%$$

$$1 \text{ ml AE.C} \rightarrow 0.081601168 \text{ g mentol} \rightarrow x$$

$$x = 9.07 \% \text{ de l-Mentol}$$

ii. **Quantification de l-Mentona**

- **Muestra AE.A de *Mentha piperita L.***

$$y = 608000 x + 15028$$

$$225704 = 60800 x + 15028$$

$$x = \frac{225704 - 15028}{60800}$$

$$x = 3.4650 \text{ ppm}$$

Conociendo la densidad del AE.A que es 1.8991 g/ml, se calcula la cantidad de l-mentona en % w/w

$$3.4650 \text{ ppm} \times \frac{25 \text{ ml}}{0.0126 \text{ ml}} \times \frac{10 \text{ ml}}{0.3376 \text{ ml}} = 203643.3649 \text{ ppm}$$

$$203643.3649 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}} = 0.2036433649 \frac{\text{g}}{\text{ml}}$$

$$1 \text{ ml AE.A} \rightarrow 0.8991 \text{ g} \rightarrow 100 \%$$

$$1 \text{ ml AE.A} \rightarrow 0.203643364 \text{ gmentona} \rightarrow x$$

$$x = 22.64 \% \text{ de l-Mentona}$$

- **Muestra AE.B de *Mentha piperita* L.**

$$y = 60800 x + 15028$$

$$145040.667 = 60800 x + 15028$$

$$x = \frac{145040.667 - 15028}{60800}$$

$$x = 2.1383 \text{ ppm}$$

Conociendo la densidad del AE.B que es 1.8994 g/ml, se calcula la cantidad de l-mentona en % w/w

$$2.1383 \text{ ppm} \times \frac{25 \text{ ml}}{0.0126 \text{ ml}} \times \frac{10 \text{ ml}}{0.2953 \text{ ml}} = 143672.832 \text{ ppm}$$

$$143672.832 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}} = 0.143672832 \frac{\text{g}}{\text{ml}}$$

$$1 \text{ ml AE. B} \rightarrow 0.8994 \text{ g} \rightarrow 100 \%$$

$$1 \text{ ml AE. B} \rightarrow 0.143672832 \text{ gmentona} \rightarrow x$$

$$x = 15.97 \% \text{ de l-Mentona}$$

- **Muestra AE.C de *Mentha piperita L.***

$$y = 60800 x + 15028$$

$$128536 = 60800 x + 15028$$

$$x = \frac{128536 - 15028}{60800}$$

$$x = 1.8669 \text{ ppm}$$

Conociendo la densidad del AE.C que es 1.8987 g/ml, se calcula la cantidad de l-mentona en % w/w

$$1.8669 \text{ ppm} \times \frac{25 \text{ ml}}{0.0154 \text{ ml}} \times \frac{10 \text{ ml}}{0.3011 \text{ ml}} = 100653.6638 \text{ ppm}$$

$$100653.6638 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}} = 0.1006536638 \frac{\text{g}}{\text{ml}}$$

$$1 \text{ ml AE.C} \rightarrow 0.8987 \text{ g} \rightarrow 100 \%$$

$$1 \text{ ml AE.C} \rightarrow 0.1006536638 \text{ gmentona} \rightarrow x$$

$$x = 11.19\% \text{ de l-Mentona}$$

iii. Cuantificación de l-Acetato de Mentilo

- **Muestra AE.A de *Mentha piperita L.***

$$y = 42067 x + 31063$$

$$307815 = 42067 x + 31063$$

$$x = \frac{307815 - 31063}{42067}$$

$$x = 6.5788 \text{ ppm}$$

Conociendo la densidad del AE.A que es 1.8991 g/ml, se calcula la cantidad de l-acetato de mentilo en % w/w

$$6.5788 \text{ ppm} \times \frac{25 \text{ ml}}{0.0126 \text{ ml}} \times \frac{10 \text{ ml}}{0.3376 \text{ ml}} = 386646.1672 \text{ ppm}$$

$$386646.1672 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}} = 0.3866461672 \frac{\text{g}}{\text{ml}}$$

$$1 \text{ ml AE.A} \rightarrow 0.8991 \text{ g} \rightarrow 100 \%$$

$$1 \text{ ml AE.A} \rightarrow 0.3866461672 \text{ gacetatodementilo} \rightarrow x$$

$$x = 43.00 \% \text{ de l-Acetato de Mentilo}$$

- **Muestra AE.Bde *Mentha piperita L.***

$$y = 42067 x + 31063$$

$$383974.33 = 42067 x + 31063$$

$$x = \frac{383974.33 - 31063}{42067}$$

$$x = 8.3892 \text{ ppm}$$

Conociendo la densidad del AE.B que es 1.8994 g/ml, se calcula la cantidad de acetato de mentilo en % w/w

$$8.3892 \text{ ppm} \times \frac{25 \text{ ml}}{0.0126 \text{ ml}} \times \frac{10 \text{ ml}}{0.2953 \text{ ml}} = 563672.1333 \text{ ppm}$$

$$563672.1333 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}} = 0.563672133 \frac{\text{g}}{\text{ml}}$$

$$1 \text{ ml AE.B} \rightarrow 0.8994 \text{ g} \rightarrow 100 \%$$

$$1 \text{ ml AE.B} \rightarrow 0.563672133 \text{ gacetatodementilo} \rightarrow x$$

$$x = 62.67 \% \text{ de l-Acetato de Mentilo}$$

- Muestra AE.C

$$y = 42067 x + 31063$$

$$381904.667 = 42067 x + 31063$$

$$x = \frac{381904.667 - 31063}{42067}$$

$$x = 8.3400 \text{ ppm}$$

Conociendo la densidad del AE.C que es 1.8987 g/ml, se calcula la cantidad de l-acetato de mentilo en % w/w

$$8.3400 \text{ ppm} \times \frac{25 \text{ ml}}{0.0154 \text{ ml}} \times \frac{10 \text{ ml}}{0.3011 \text{ ml}} = 449649.9847 \text{ ppm}$$

$$449649.9847 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}} = 0.4496499847 \frac{\text{g}}{\text{ml}}$$

$$1 \text{ ml AE.C} \rightarrow 0.8987 \text{ g} \rightarrow 100 \%$$

$$1 \text{ ml AE.C} \rightarrow 0.4496499847 \text{ g acetato de mentilo} \rightarrow x$$

$$x = 50.03 \% \text{ de l-Acetato de Mentilo}$$

Las tres muestras de AE. De *Mentha piperita L.* obtenido, correspondientes a: Muestra A , Muestra B y Muestra C, fueron obtenidas desecadas del mismo distribuidor, del mismo lugar de origen, pero de distintos lotes, por cuestiones logísticas de tiempo de siembra, cosecha y terreno de cultivo , que aun tratándose de un mismo fenotipo, presenta diferencias en su composición (quimiotipo).

Sin embargo las tres muestras tienen la particularidad de contener elevadas concentraciones de Acetato de Mentilo: Muestra A: 43.00%, Muestra B: 62.67 % y Muestra C: 50.03 %, seguido de las concentraciones de Mentona: Muestra A: 22.65%, muestra B: 15.97 % y Muestra C: 11.19 %, y por último las concentraciones de Mentol: Muestra A: 10.94%, muestra B: 10.16% y Muestra C: 9.07%. Concentraciones muy bajas de Mentol que no corresponden a los valores exigidos por las normas y organismos reguladores de la calidad del aceite esencial de *Mentha piperita L.*, como la Farmacopea Británica (Mentol: 30-55%), Norma Técnica Peruana (mentol: 30-55%), etc. Considerando al Mentol como primer valor referente de calidad en el AE. de *Mentha piperita L.*, por su importancia económica ya que se utiliza en productos de higiene oral, productos farmacéuticos, cosméticos y alimenticios, y también por su alto potencial farmacológico (anti fúngico, antibacteriano, etc.).

Teniendo en cuenta estos valores obtenidos, se puede referir que el valor agregado en la cadena productiva de aceites esenciales esta en el refinamiento de los aceites, concentrando el contenido de un componente en particular del producto, que en este caso podría ser el Acetato de Mentilo, que si bien no tiene gran importancia económica, también es requerido por distintas industrias como la perfumería, destacando notas florales, especialmente de rosas, aguas de tocador, que tiene olor a lavanda, etc. Por lo que se puede afirmar también que la exigencia de control de calidad, difiere según el uso final que se le dará a la planta o al aceite esencial que de ella se obtenga.

Sin embargo, los resultados pueden haber sido discrepantes, debido a diferentes factores y condiciones a las que las plantas fueron sometidas directa o indirectamente, que interfieren con su composición, como se explicara continuación:

- 1- Durante la síntesis de aceite esencial de *M. piperita L.*, la recta de isoprenoides conduce a la formación de geranil pirofosfato, desde el que se origina el limoneno, junto a la piperitona, que a su vez forma la pulegona que puede formar mentona y/o mentofurano. La mentona forma el neomentol y el mentol,

- que pueden someterse a esterificación y por lo tanto se convierte en acetato de mentilo. Por lo que se entiende que las condiciones a las que estuvieron expuestas las plantas favorecieron la producción de acetato de mentilo.³⁹
- 2- La fertilización con niveles de crecientes de N, P y K en *Mentha piperita L.* aumenta el contenido de acetato de mentilo.^{5,40}
 - 3- La composición del AE., depende de las condiciones edafológicas y la etapa ontogénica de la planta, por lo que determinar con precisión la fecha de cultivo y cosecha es importante, así como el fotoperiodo. Esta afirmación puede justificar las variaciones en la composición bajo condiciones de cultivo diferente, incluyendo niveles altos de acetato de mentilo.^{5,40,41}
 - 4- La floración de las plantas de *Mentha piperita L.* bajo condiciones de día corto disminuye el contenido de mentol que es de fotoperiodo largo, incrementando los niveles de acetato de mentilo por enzima del 10%.^{5,40,41}
 - 5- Plantas maduras, aumenta el porcentaje de ésteres, mientras que el contenido de mentol está relacionado con el contenido de los ésteres.^{5,40,41}
 - 6- La reducción de mentol y la posterior síntesis y acumulación de acetato de mentilo parecen ser procesos enzimáticos asociados con la maduración y el comienzo del crecimiento reproductivo en la menta. Esta relación metabólica posible está actualmente disponible y casi no se sabe nada acerca de las enzimas y los mecanismos implicados en la reducción o bien esterificación del mentol, etc.⁴⁰

Es así, que hoy en día existe un gran interés y estudios acerca de los efectos de tiempo de cosecha, medios de cultivo, fertilización, e incluso partes y posiciones de la planta que contribuyen a la composición y rendimiento del AE. De *Mentha piperita L.*^{42, 43}

Por lo que se puede concluir que estos factores se pueden modificar, mejorar, etc., estratégicamente para las necesidades que el mercado requiera.

CONCLUSIONES

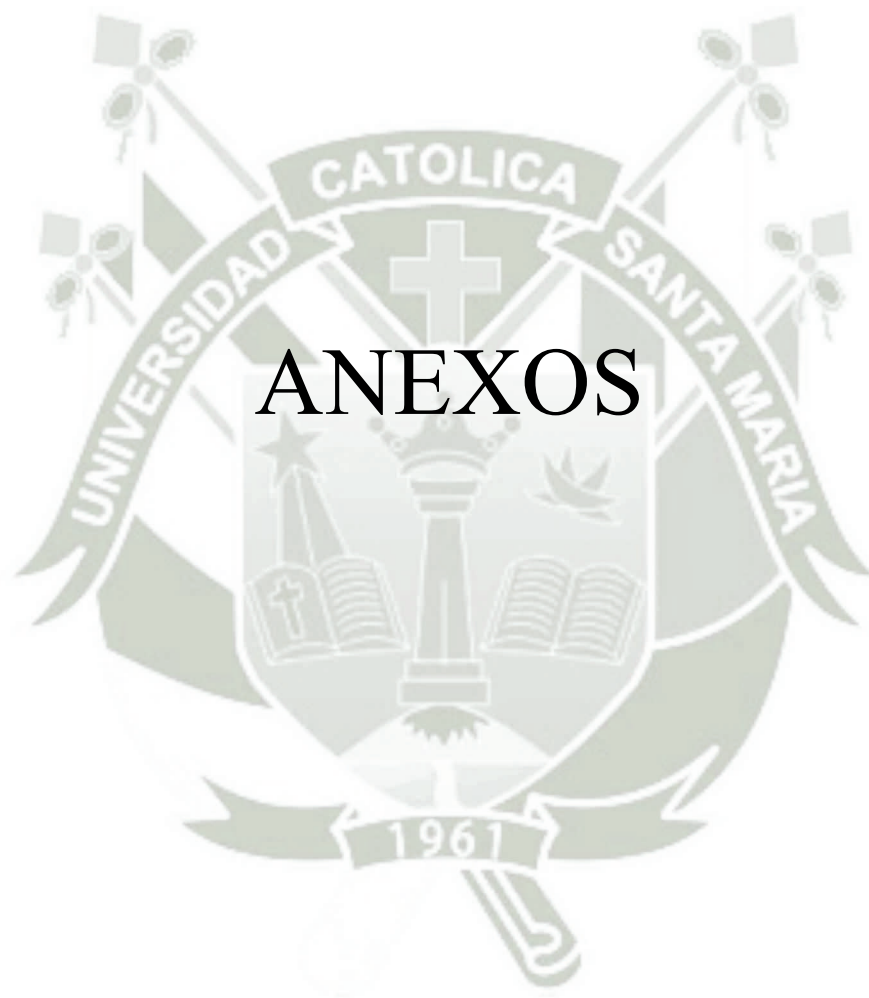
- I. Se obtuvo tres muestras de Aceite Esencial de *Mentha piperita L.* por método de Hidrodestilación con Trampa Clevenger, obteniendo los siguientes porcentajes de rendimiento de aceite esencial: Muestra A: 1.18%, Muestra B: 0.61% y Muestra C: 0.88%.
- II. Se determinó las principales características fisicoquímicas de las tres muestras (A, B y C) de Aceite Esencial de *Mentha piperita L.*, obteniendo los siguientes resultados: Características Organolépticas (olor característico, sabor picante y color verde traslucido), Poder Rotatorio (A: -30° , B: -27.5° y C: -27.5°), Densidad (A: 0.8991g/ml, B: 0.8994g/ml y C: 0.8987g/ml), Índice de Refracción (A: 1.4643, B: 1.4573 y C: 1.4622) e Índice de Acidez (A. 1.6715 mg KOH/g de aceite, B: 1.6881 mg KOH/g de aceite, y C: 1.5759 mg KOH/g de aceite,).
- III. Se sintetizó y purificó los estándares l-Mentona y l-Acetato de mentilo a partir del estándar de l-Mentol
- IV. Se evaluó el Contenido de l-Mentol, l-Mentona y l-Acetato de mentilo de las tres muestras de aceite esencial de *Mentha piperita L.*, de acuerdo a los resultados obtenidos en la cuantificación por método de patrón externo mediante GC-MS: Muestra A (Mentol 10.93%, Mentona 22.64% y Acetato de Mentilo 43.00%), Muestra B (Mentol 10.16%, Mentona 15.97% y Acetato de Mentilo 62.67%) y Muestra C (Mentol 9.07%, Mentona 11.19% y Acetato de Mentilo 50.03%)

BIBLIOGRAFIA

1. Ortuño M, Manual Practico de Aceites Esenciales, Aromas y Perfumes, Ediciones Aiyana, 2006.
2. Kuklinski C., Farmacognosia, Ediciones Omega S.A., Barcelona, 2000.
3. Uso Industrial de Plantas Aromáticas y Medicinales
<http://ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal>.
4. Robert H., Chromatographic Measurement of Variations in Essential Oils withim a Single Plant, Vol. 5, USA, 1997.
5. Muñoz F., Plantas Medicinales y Aromáticas, Estudio Cultivo y Procesado, Ediciones Mundi, España, 1996.
6. Lock O., Investigación Fitoquímica, Métodos de Estudio de Productos Naturales, Fondo Editorial PUCP, 1988.
7. Diaz O., Estudio Comparativo de la Composición Química de la Actividad Antioxidante de Aceite Esencial de Aloysia thriphylla, Colombia, 2007.
8. Keese R., Muller K., métodos de Laboratorio parar Química Orgánica, Editorial Linusa S.A., México, 1990.
9. Fessenden R., Fessenden J., Technique and Experiments for organic Chemistry, University of Montana, 1996.
10. Gunther E., The Essential Oils, D. Van Nostrand Company, Tnc, USA, 1948.
11. Cerpa M., Hidrodestilación de Aceites esenciales, Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente, Valladolid, 2007.
12. Atofani D., Zamfirache M., Anca A., Improved Techniques for Obtaining Volatiles Oils Concerning Their Quantitative Analysis from Lamiaceae Taxons, Romania, 2010.
13. Brithish Herbal Pharmacopoeia, published by the British Herbal Medicine Association, vol. 1, 1990.
14. Manual para la Producción de Plantas Aromáticas y Medicinales, MINDES, 2007.
15. Delparte C, Productos Naturales, Farmacognosia, universidad de Chile, 2010.
16. Asian journal of Pharmaceutical and Clinical Research, Vol. 2, Issue 2, April-June, 2009.

17. Longwood Herbal Task Force
<http://www.mep.edu/herbal>.
18. The Merck Index, USA, 2001.
19. USP 35, Farmacopea de los Estados Unidos de América, Mayo, 2012.
20. Control de Calidad de Aceites esenciales.
http://www.slidesbase.mt/profegilde/analisis_y_control_de_aceites_esenciales.
21. Olguin L. rodriguez M., Cromatografía de Gases, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biotecnología, México, 2004.
22. Jork H., Kunk W., Fischer W., Thyn layer Chromatography Reagents and Detection Methods, Alemania, 1990.
23. Cromatografía en Capa Fina.
<http://es.scribd.com/doc/14172689/5-Cromatografia-en-Capa-Fina>
24. Nigan M., essential Oils and their Constituents XXV Thyn Layer Chromatography Some Chemical and Chemotaxonomic Applications. New York, 1964.
25. Rubinson K., Rubinson J., Análisis Instrumental, Pearson Educación S.A., Madrid, 2001.
26. Harold M., MCnair J., Muller M., Basic Gas Chromatography, Wiley Publication, Canada, 2009.
27. Neesin W., practice of Gas Chromatography-Mass Spectrometry, USA, 2001.
28. Kitson F., MCEwar Ch., Gas Chromatography and Mass Spectrometry, Academic Press, USA, 1996.
29. Stuart B., practical Laboratory skills Training Guides Gas Chromatography, Published for the LGC, UK, 2003.
30. Cromatografía de Gases.
www.mncn.csic.es/./cromatografia/.pdf
31. Seminario sobre Cromatografía
www.4.ujaen.es/mferma/master%2000pdf.
32. ELSERVIER Journal of Chromatography, gas Chromatography Technologies for the analysis of essential Oils, 2001.
33. Magni P., Facchetti R., Cadoppi A., Analysis of Essential Oils by Ultra Fast GC., University of Turin, Italy, 2005.
34. Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual (INDECOPI), Norma Técnica Peruana, Perú, 1974.

35. Phillips C., Organic Syntheses Coll. Vol. 1, 1941.
36. British Pharmacopoeia, Monograph 0405, Copyright, 2011.
37. SDBS, Spectral Database for Organic compounds, National Institute of advanced industrial Science and technology (AIST), Japan .
http://sdb.sriodb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top.cgi
38. NIST, National Institute of Standards and technology, USA.
<http://webbook.nist.gov/chemistry/>
39. Murrey M., Genetic Observations on Mentha Oil Biogenesis, USA, 1972.
40. Research Article, Yield and Composition of essential Oil of Mentha Piperita L., Universidad Estadual Paulista, Instituto Biociencias, Brasil, 2005.
41. Journal of Agricultural and food Chemistry, Effect of Harvest Time and Drying method On Biomass production, essential Oil Yield and Quality of Peppermint (Mentha piperita L.), 2005.
42. Journal of Agricultural and food Chemistry, Monoterpene composition of Essential Oil from peppermint (Mentha piperita L.) with Regard to Leaf Positions, 1999.
43. Aromatic Plants of Morocco, GC/MS Analysis of the Essential oils of Leaves of Mentha piperita L., American-Eurasian Network for Scientific information Advances in Environmental Biology, 2010.



ANEXOS

ANALISIS GC-MS: ESTANDAR MENTOL

Sample Information

Analyzed by : Admin
 Sample Type : Unknown
 Level # : 1
 Sample Name : std mentol
 Sample ID : std mentol
 IS Amount : [1]=1
 Sample Amount : 1
 Dilution Factor : 1
 Vial # : 1

Method

==== Analytical Line 1 =====

[AQC-20i]
 # of Rinses with Presolvent :3
 # of Rinses with Solvent(post) :3
 # of Rinses with Sample :3
 Plunger Speed(Suction) :High
 Viscosity Comp. Time :0.2 sec
 Plunger Speed(Injection) :High
 Syringe Insertion Speed :High
 Injection Mode :Normal
 Pumping Times :5
 Inj. Port Dwell Time :0.3 sec
 Terminal Air Gap :No
 Plunger Washing Speed :High
 Washing Volume :8uL
 Syringe Suction Position :0.0 mm
 Syringe Injection Position :0.0 mm
 Use 3 Solvent Vial :1 vial

[GC-2010]
 Column Oven Temp. :40.0 °C
 Injection Temp. :240.00 °C
 Injection Mode :Splitless
 Sampling Time :2.00 min
 Flow Control Mode :Pressure
 Pressure :54.2 kPa
 Total Flow :30.0 mL/min
 Column Flow :1.06 mL/min
 Linear Velocity :37.2 cm/sec
 Purge Flow :3.0 mL/min
 Split Ratio :-1.0
 Oven Temp. Program

Rate	Temperature(°C)	Hold Time(min)
-	40.0	3.00
40.00	110.0	10.00
20.00	200.0	0.00
15.00	240.0	1.00

< Ready Check Heat Unit >
 Column Oven : Yes
 SPL1 : Yes
 MS : Yes
 < Ready Check Detector(FTD) >
 < Ready Check Baseline Drift >
 < Ready Check Injection Flow >
 SPL1 Carrier : Yes
 SPL1 Purge : Yes
 < Ready Check APC Flow >
 < Ready Check Detector APC Flow >
 External Wait :No
 Equilibrium Time :3.0 min

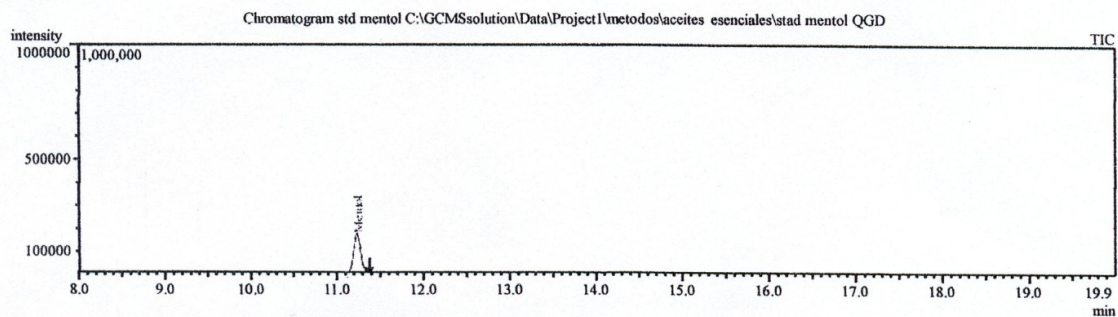
[GC Program]

[GCMS-QP2010 Ultra]
 IonSourceTemp :200.00 °C
 Interface Temp. :240.00 °C
 Solvent Cut Time :5.00 min
 Detector Gain Mode :Relative
 Detector Gain :0.70 kV +0.00 kV
 Threshold :0

[MS Table]
-Group 1 - Event 1-
Start Time :8.00min
End Time :20.00min
ACQ Mode :Scan
Event Time :0.30sec
Scan Speed :1250
Start m/z :40.00
End m/z :400.00

Sample Inlet Unit :GC

[MS Program]
Use MS Program :OFF



Spectrum

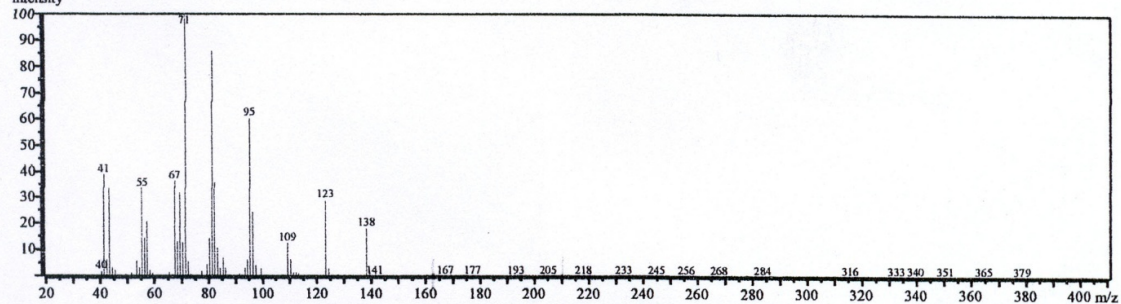
Line#:1 R.Time:11.155(Scan#:632)

MassPeaks:144

RawMode:Averaged 11.060-11.260(613-653) BasePeak:71(7882)

BG Mode:Averaged 12.685-12.895(938-980) Group 1 - Event 1

intensity



ANALISIS GC-MS: ESTANDAR MENTONA

Sample Information

Analyzed by : Admin
 Sample Type : Standard
 Level # : 1
 Sample Name : mentona
 Sample ID : mentona
 IS Amount : [1]=1
 Sample Amount : 1
 Dilution Factor : 1
 Vial # : 1

Method

==== Analytical Line 1 =====

[AOC-20i]
 # of Rinses with Presolvent :3
 # of Rinses with Solvent(post) :3
 # of Rinses with Sample :3
 Plunger Speed(Suction) :High
 Viscosity Comp. Time :0.2 sec
 Plunger Speed(Injection) :High
 Syringe Insertion Speed :High
 Injection Mode :Normal
 Pumping Times :5
 Inj. Port Dwell Time :0.3 sec
 Terminal Air Gap :No
 Plunger Washing Speed :High
 Washing Volume :8uL
 Syringe Suction Position :0.0 mm
 Syringe Injection Position :0.0 mm
 Use 3 Solvent Vial :1 vial

[GC-2010]
 Column Oven Temp. :40.0 °C
 Injection Temp. :240.00 °C
 Injection Mode :Splitless
 Sampling Time :2.00 min
 Flow Control Mode :Pressure
 Pressure :54.2 kPa
 Total Flow :30.0 mL/min
 Column Flow :1.06 mL/min
 Linear Velocity :37.2 cm/sec
 Purge Flow :3.0 mL/min
 Split Ratio :-1.0
 Oven Temp. Program

Rate	Temperature(°C)	Hold Time(min)
-	40.0	3.00
40.00	110.0	10.00
20.00	200.0	0.00
15.00	240.0	1.00

< Ready Check Heat Unit >
 Column Oven : Yes
 SPL1 : Yes
 MS : Yes
 < Ready Check Detector(FTD) >
 < Ready Check Baseline Drift >
 < Ready Check Injection Flow >
 SPL1 Carrier : Yes
 SPL1 Purge : Yes
 < Ready Check APC Flow >
 < Ready Check Detector APC Flow >
 External Wait :No
 Equilibrium Time :3.0 min

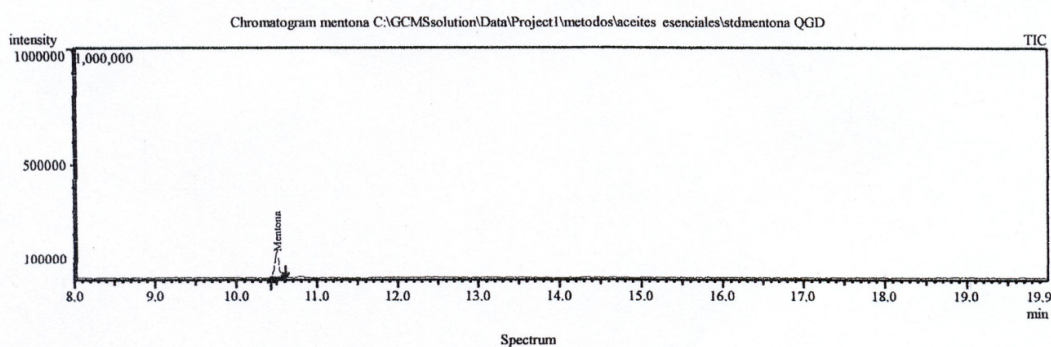
[GC Program]

[GCMS-QP2010 Ultra]
 IonSourceTemp :200.00 °C
 Interface Temp. :240.00 °C
 Solvent Cut Time :5.00 min
 Detector Gain Mode :Relative
 Detector Gain :0.70 kV +0.00 kV

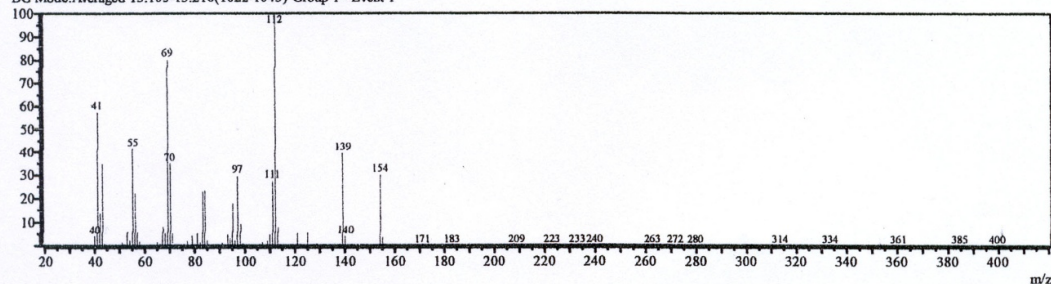
[MS Table]
-Group 1 - Event 1-
Start Time :8.00min
End Time :20.00min
ACQ Mode :Scan
Event Time :0.30sec
Scan Speed :1250
Start m/z :40.00
End m/z :400.00

Sample Inlet Unit :GC

[MS Program]
Use MS Program :OFF



Line#:1 R.Time:10.485(Scan#:498)
MassPeaks:119
RawMode:Averaged 10.410-10.605(483-522) BasePeak:112(5236)
BG Mode:Averaged 13.105-13.210(1022-1043) Group 1 - Event 1



ANALISIS GC-MS: ESTANDAR ACETATO DE MENTILO

Sample Information

Analyzed by : Admin
 Sample Type : Standard
 Level # : 1
 Sample Name : std acetato
 Sample ID : std acetato
 IS Amount : [1]=1
 Sample Amount : 1
 Dilution Factor : 1
 Vial # : 1

Method

==== Analytical Line 1 =====

[AOC-201]
 # of Rinses with Presolvent :3
 # of Rinses with Solvent(post) :3
 # of Rinses with Sample :3
 Plunger Speed(Suction) :High
 Viscosity Comp. Time :0.2 sec
 Plunger Speed(Injection) :High
 Syringe Insertion Speed :High
 Injection Mode :Normal
 Pumping Times :5
 Inj. Port Dwell Time :0.3 sec
 Terminal Air Gap :No
 Plunger Washing Speed :High
 Washing Volume :8uL
 Syringe Suction Position :0.0 mm
 Syringe Injection Position :0.0 mm
 Use 3 Solvent Vial :1 vial

[GC-2010]
 Column Oven Temp. :40.0 °C
 Injection Temp. :240.00 °C
 Injection Mode :Splitless
 Sampling Time :2.00 min
 Flow Control Mode :Pressure
 Pressure :54.2 kPa
 Total Flow :30.0 mL/min
 Column Flow :1.06 mL/min
 Linear Velocity :37.2 cm/sec
 Purge Flow :3.0 mL/min
 Split Ratio :-1.0
 Oven Temp. Program

Rate	Temperature(°C)	Hold Time(min)
-	40.0	3.00
40.00	110.0	10.00
20.00	200.0	0.00
15.00	240.0	1.00

< Ready Check Heat Unit >
 Column Oven : Yes
 SPL1 : Yes
 MS : Yes
 < Ready Check Detector(FTD) >
 < Ready Check Baseline Drift >
 < Ready Check Injection Flow >
 SPL1 Carrier : Yes
 SPL1 Purge : Yes
 < Ready Check APC Flow >
 < Ready Check Detector APC Flow >
 External Wait :No
 Equilibrium Time :3.0 min

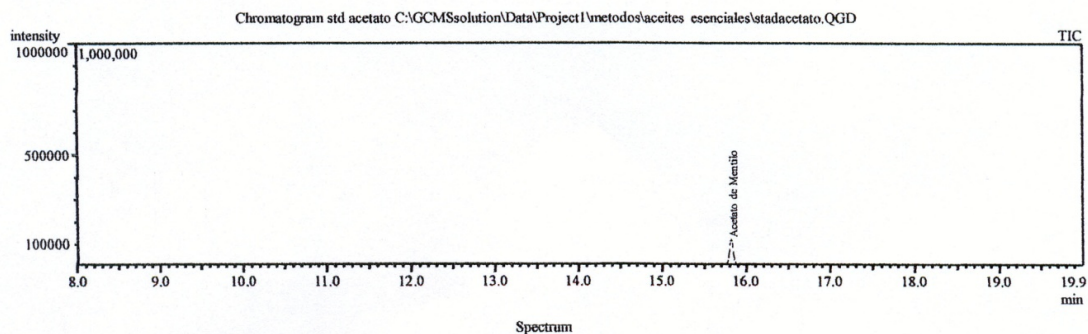
[GC Program]

[GCMS-QP2010 Ultra]
 IonSourceTemp :200.00 °C
 Interface Temp. :240.00 °C
 Solvent Cut Time :5.00 min
 Detector Gain Mode :Relative
 Detector Gain :0.70 kV +0.00 kV

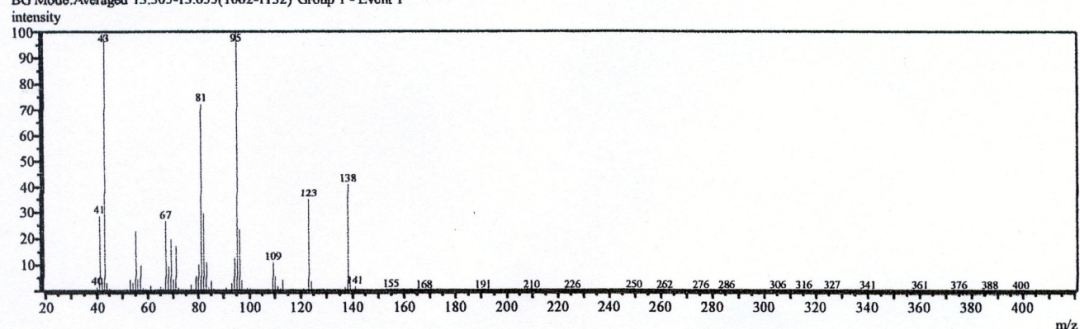
[MS Table]
-Group 1 - Event 1-
Start Time :8.00min
End Time :20.00min
ACQ Mode :Scan
Event Time :0.30sec
Scan Speed :1250
Start m/z :40.00
End m/z :400.00

Sample Inlet Unit :GC

[MS Program]
Use MS Program :OFF



Line#:1 R.Time:15.815(Scan#:1564)
MassPeaks:282
RawMode:Averaged 15.750-15.925(1551-1586) BasePeak:95(5341)
BG Mode:Averaged 13.305-13.655(1062-1132) Group 1 - Event 1



ANALISIS GC-MS: AE.A

Sample Information

Analyzed by : Admin
 Sample Type : Unknown
 Level # : 1
 Sample Name : ae.A
 Sample ID : ae.A
 IS Amount : [1]=1
 Sample Amount : 1
 Dilution Factor : 1
 Vial # : 1

Method

==== Analytical Line 1 =====

[AOC-201]
 # of Rinses with Presolvent :3
 # of Rinses with Solvent(post) :3
 # of Rinses with Sample :3
 Plunger Speed(Suction) :High
 Viscosity Comp. Time :0.2 sec
 Plunger Speed(Injection) :High
 Syringe Insertion Speed :High
 Injection Mode :Normal
 Pumping Times :5
 Inj. Port Dwell Time :0.3 sec
 Terminal Air Gap :No
 Plunger Washing Speed :High
 Washing Volume :8uL
 Syringe Suction Position :0.0 mm
 Syringe Injection Position :0.0 mm
 Use 3 Solvent Vial :1 vial

[GC-2010]
 Column Oven Temp. :40.0 °C
 Injection Temp. :240.00 °C
 Injection Mode :Splitless
 Sampling Time :2.00 min
 Flow Control Mode :Pressure
 Pressure :54.2 kPa
 Total Flow :30.0 mL/min
 Column Flow :1.06 mL/min
 Linear Velocity :37.2 cm/sec
 Purge Flow :3.0 mL/min
 Split Ratio :-1.0
 Oven Temp. Program

Rate	Temperature(°C)	Hold Time(min)
-	40.0	3.00
40.00	110.0	10.00
20.00	200.0	0.00
15.00	240.0	1.00

< Ready Check Heat Unit >
 Column Oven : Yes
 SPLI : Yes
 MS : Yes
 < Ready Check Detector(FTD) >
 < Ready Check Baseline Drift >
 < Ready Check Injection Flow >
 SPLI Carrier : Yes
 SPLI Purge : Yes
 < Ready Check APC Flow >
 < Ready Check Detector APC Flow >
 External Wait :No
 Equilibrium Time :3.0 min

[GC Program]

[GCMS-QP2010 Ultra]
 IonSourceTemp :200.00 °C
 Interface Temp. :240.00 °C
 Solvent Cut Time :5.00 min
 Detector Gain Mode :Relative

Detector Gain :0.70 kV +0.00 kV

[MS Table]

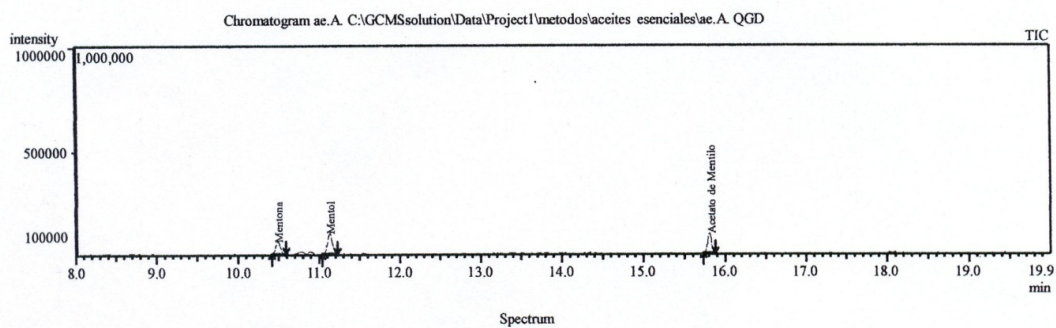
-Group 1 - Event 1-

Start Time :8.00min
End Time :20.00min
ACQ Mode :Scan
Event Time :0.30sec
Scan Speed :1250
Start m/z :40.00
End m/z :400.00

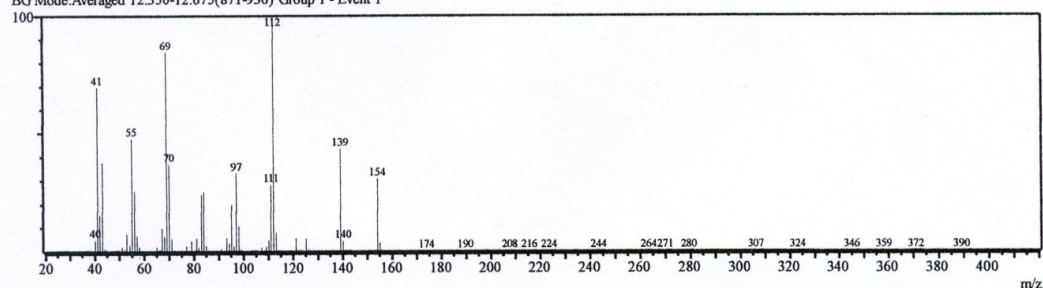
Sample Inlet Unit :GC

[MS Program]

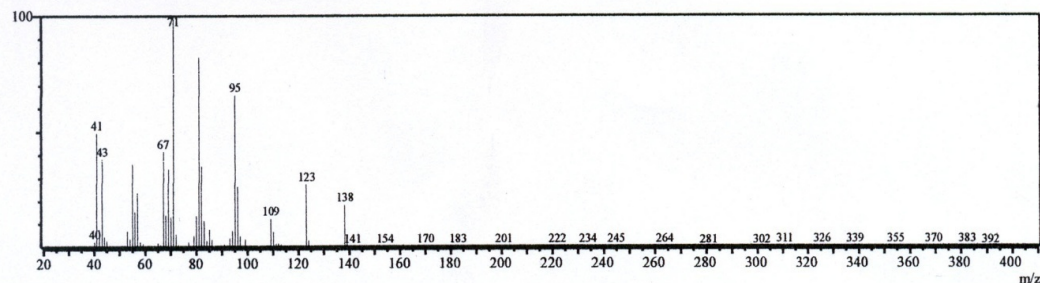
Use MS Program :OFF



Line#:86 R.Time:10.480(Scan#:497)
MassPeaks:323
RawMode:Averaged 10.395-10.595(480-520) BasePeak:112(2498)
BG Mode:Averaged 12.350-12.675(871-936) Group 1 - Event 1



Line#:87 R.Time:11.125(Scan#:626)
MassPeaks:152
RawMode:Averaged 11.025-11.225(606-646) BasePeak:71(4384)
BG Mode:Averaged 12.245-12.400(850-881) Group 1 - Event 1

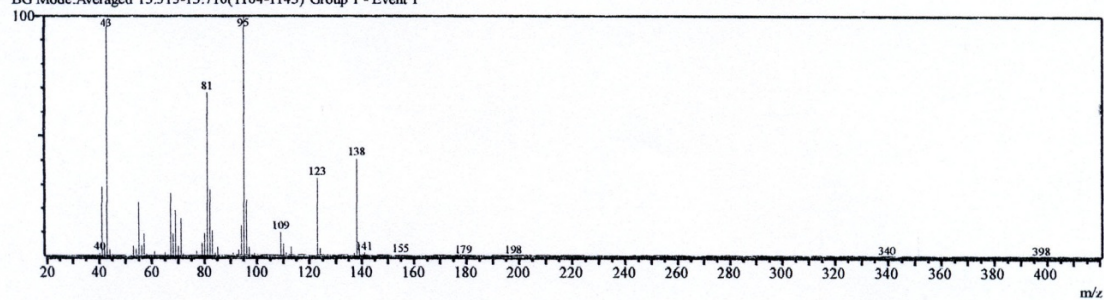


Line#:88 R.Time:15.810(Scan#:1563)

MassPeaks:75

RawMode:Averaged 15.735-15.865(1548-1574) BasePeak:95(6068)

BG Mode:Averaged 13.515-13.710(1104-1143) Group 1 - Event 1



ANALISIS GC-MS: AE.B

Sample Information

Analyzed by : Admin
 Sample Type : Unknown
 Level # : 1
 Sample Name : a.e.B.
 Sample ID : a.e.B.
 IS Amount : [1]=1
 Sample Amount : 1
 Dilution Factor : 1
 Vial # : 1

Method

==== Analytical Line 1 =====

[AOC-20]
 # of Rinses with Presolvent :3
 # of Rinses with Solvent(post) :3
 # of Rinses with Sample :3
 Plunger Speed(Suction) :High
 Viscosity Comp. Time :0.2 sec
 Plunger Speed(Injection) :High
 Syringe Insertion Speed :High
 Injection Mode :Normal
 Pumping Times :5
 Inj. Port Dwell Time :0.3 sec
 Terminal Air Gap :No
 Plunger Washing Speed :High
 Washing Volume :8uL
 Syringe Suction Position :0.0 mm
 Syringe Injection Position :0.0 mm
 Use 3 Solvent Vial :1 vial

[GC-2010]
 Column Oven Temp. :40.0 °C
 Injection Temp. :240.00 °C
 Injection Mode :Splitless
 Sampling Time :2.00 min
 Flow Control Mode :Pressure
 Pressure :54.2 kPa
 Total Flow :30.0 mL/min
 Column Flow :1.06 mL/min
 Linear Velocity :37.2 cm/sec
 Purge Flow :3.0 mL/min
 Split Ratio :-1.0

Oven Temp. Program	Rate	Temperature(°C)	Hold Time(min)
-	-	40.0	3.00
	40.00	110.0	10.00
	20.00	200.0	0.00
	15.00	240.0	1.00

< Ready Check Heat Unit >
 Column Oven : Yes
 SPL1 : Yes
 MS : Yes
 < Ready Check Detector(FTD) >
 < Ready Check Baseline Drift >
 < Ready Check Injection Flow >
 SPL1 Carrier : Yes
 SPL1 Purge : Yes
 < Ready Check APC Flow >
 < Ready Check Detector APC Flow >
 External Wait :No
 Equilibrium Time :3.0 min

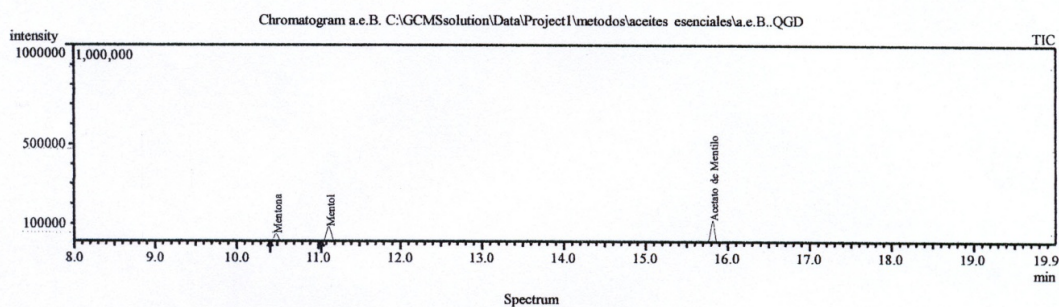
[GC Program]

[GCMS-QP2010 Ultra]
 IonSourceTemp :200.00 °C
 Interface Temp. :240.00 °C
 Solvent Cut Time :5.00 min
 Detector Gain Mode :Relative
 Detector Gain :0.70 kV +0.00 kV

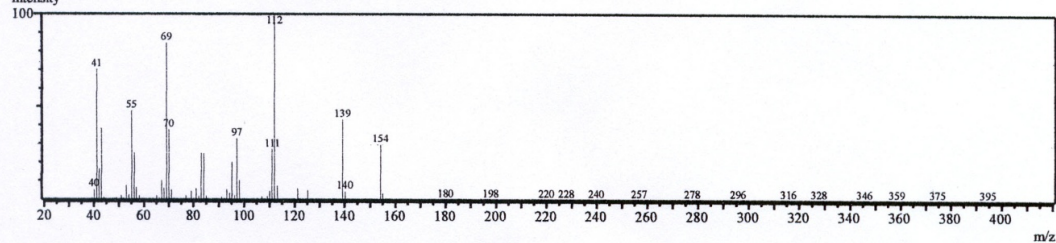
[MS Table]
-Group 1 - Event 1-
Start Time :8.00min
End Time :20.00min
ACQ Mode :Scan
Event Time :0.30sec
Scan Speed :1250
Start m/z :40.00
End m/z :400.00

Sample Inlet Unit :GC

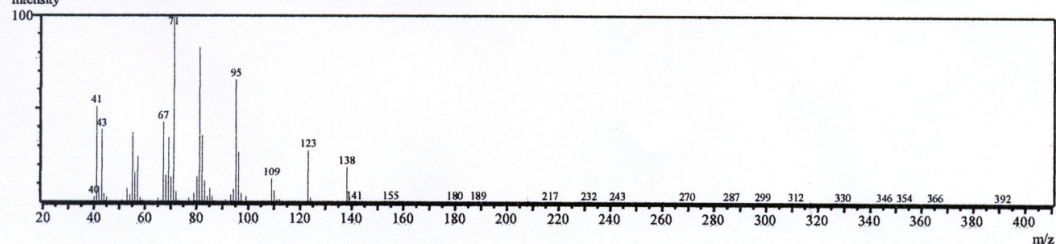
[MS Program]
Use MS Program :OFF



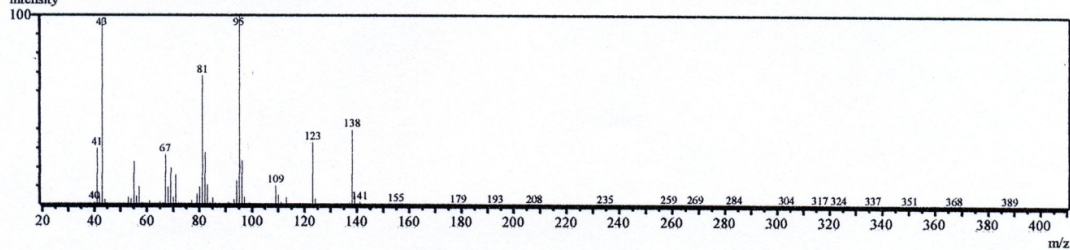
Line#:17 RTime:10.480(Scan#:497)
MassPeaks:173
RawMode:Averaged 10.410-10.585(483-518) BasePeak:112(1870)
BG Mode:Averaged 12.675-12.900(936-981) Group 1 - Event 1



Line#:18 RTime:11.125(Scan#:626)
MassPeaks:123
RawMode:Averaged 11.050-11.225(611-646) BasePeak:71(3917)
BG Mode:Averaged 12.850-13.095(971-1020) Group 1 - Event 1



Line#:19 R.Time:15.820(Scan#:1565)
MassPeaks:133
RawMode:Averaged 15.735-15.925(1548-1586) BasePeak:95(5059)
BG Mode:Averaged 13.630-13.830(1127-1167) Group 1 - Event 1
intensity



ANALISIS GC-MS: AE.C

Sample Information

Analyzed by : Admin
 Sample Type : Unknown
 Level # : 1
 Sample Name : a.e.C.
 Sample ID : a.e.C.
 IS Amount : [1]=1
 Sample Amount : 1
 Dilution Factor : 1
 Vial # : 1

Method

==== Analytical Line 1 =====

[AOC-20]
 # of Rinses with Presolvent :3
 # of Rinses with Solvent(post) :3
 # of Rinses with Sample :3
 Plunger Speed(Suction) :High
 Viscosity Comp. Time :0.2 sec
 Plunger Speed(Injection) :High
 Syringe Insertion Speed :High
 Injection Mode :Normal
 Pumping Times :5
 Inj. Port Dwell Time :0.3 sec
 Terminal Air Gap :No
 Plunger Washing Speed :High
 Washing Volume :8uL
 Syringe Suction Position :0.0 mm
 Syringe Injection Position :0.0 mm
 Use 3 Solvent Vial :1 vial

[GC-2010]
 Column Oven Temp. :40.0 °C
 Injection Temp. :240.00 °C
 Injection Mode :Splitless
 Sampling Time :2.00 min
 Flow Control Mode :Pressure
 Pressure :54.2 kPa
 Total Flow :30.0 mL/min
 Column Flow :1.06 mL/min
 Linear Velocity :37.2 cm/sec
 Purge Flow :3.0 mL/min
 Split Ratio :-1.0
 Oven Temp. Program

Rate	Temperature(°C)	Hold Time(min)
-	40.0	3.00
40.00	110.0	10.00
20.00	200.0	0.00
15.00	240.0	1.00

< Ready Check Heat Unit >
 Column Oven : Yes
 SPL1 : Yes
 MS : Yes
 < Ready Check Detector(FTD) >
 < Ready Check Baseline Drift >
 < Ready Check Injection Flow >
 SPL1 Carrier : Yes
 SPL1 Purge : Yes
 < Ready Check APC Flow >
 < Ready Check Detector APC Flow >
 External Wait : No
 Equilibrium Time : 3.0 min

[GC Program]

[GCMS-QP2010 Ultra]
 IonSourceTemp :200.00 °C
 Interface Temp. :240.00 °C
 Solvent Cut Time :5.00 min
 Detector Gain Mode :Relative

Detector Gain :0.70 kV +0.00 kV

[MS Table]

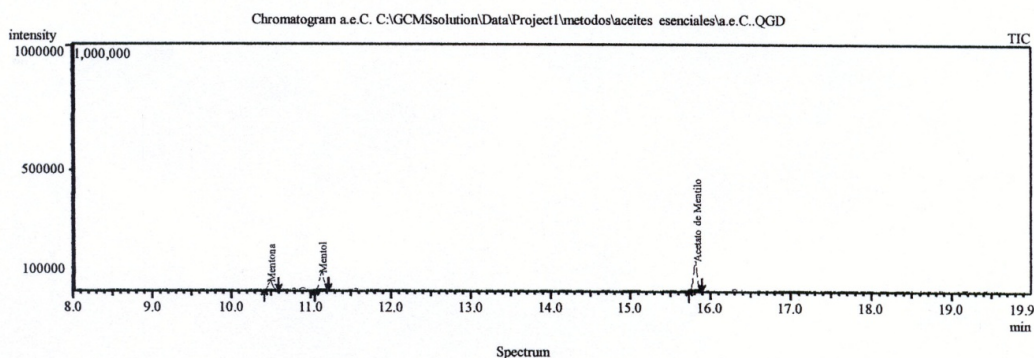
-Group 1 - Event 1-

Start Time :8.00min
End Time :20.00min
ACQ Mode :Scan
Event Time :0.30sec
Scan Speed :1250
Start m/z :40.00
End m/z :400.00

Sample Inlet Unit :GC

[MS Program]

Use MS Program :OFF

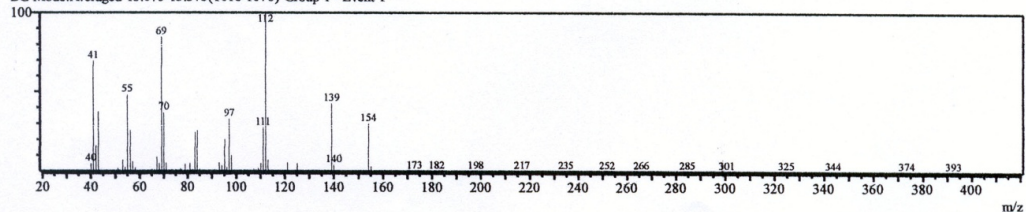


Line#:1 R.Time:10.485(Scan#:498)

MassPeaks:110

RawMode:Averaged 10.395-10.585(480-518) BasePeak:112(1370)

BG Mode:Averaged 13.075-13.375(1016-1076) Group 1 - Event 1



Line#:2 R.Time:11.130(Scan#:627)

MassPeaks:74

RawMode:Averaged 11.050-11.210(611-643) BasePeak:71(3787)

BG Mode:Averaged 12.420-12.710(885-943) Group 1 - Event 1

